



**Consejo Superior de
Investigaciones
Científicas**



**Departamento de Nutrición Vegetal
Estación Experimental de Aula Dei
Zaragoza**

Tesis Doctoral

**Caracterización fisiológica del Bitter Pit: aspectos
nutricionales, fenológicos y de diagnóstico.**

Memoria presentada por Dña. Yolanda Aznar Antoñanzas

Licenciada en Ciencias, Sección Químicas, para optar al
grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, 17 de septiembre de 2001

Durante este tiempo son muchas las personas que de una manera u otra han contribuido a que el trabajo realizado diera su fruto. A través de estas líneas quisiera agradecer a todas ellas su apoyo y ayuda tanto a nivel científico como personal.

En primer lugar, al Dr. Jesús Val por el esfuerzo invertido en la dirección de esta tesis, así como en mi formación, por su dedicación y paciencia durante estos años.

Al Dr. Álvaro Blanco, por su interés, por compartir conmigo sus conocimientos en agronomía y estar dispuesto en cualquier momento a solucionarme cualquier duda.

Al Dr. Emilio Monge por iniciarme en la técnica de Electroforesis Capilar, mi fiel aunque rebelde compañera de fatigas.

Al grupo A.L.M, en la persona de Juan Negueroles y en la de Ramón Quilez por su disposición colaboradora y por las facilidades prestadas en todo momento.

A Sumalsa, por los servicios prestados.

A la Estación Experimental de Aula Dei y más concretamente al Departamento de Nutrición Vegetal por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto así como por poner a mi disposición todos los medios necesarios.

A mi grupo de laboratorio, capitaneado por nuestra “Jefa” M^a Ángeles, por su amistad y cariño desde el primer momento; a Estrella por su continua colaboración, a Ratiba por esos muestreos inolvidables (F y TF), a Ana Pilar, a Marta, a Carmenipe, al resto de compañeros que han pasado por el laboratorio que, aunque esporádicamente, han contribuido a mantenerlo vivo; y especialmente a María y Pili-Q siempre dispuestas a compartir trabajo y amistad dentro y fuera del laboratorio.

Al resto de compañeros del departamento, Aurora, Yolanda, Sofía, Ajmi, Fermín, Yi-Chiech, Tatiana, Ana, Piluca, Fernando, Javier, Gloria, María-C, Mariví Ramiro, Curra, Raquel, María, David; a los que estuvieron y ya no están: Luis, Elena-G, Elena-T, Maya, Ana-Flor, Manu, Iñaki, Kepa, Roberto. Y por supuesto, a MC, Mariví y Miguel por ser algo más que compañeros, compartiendo los buenos y no tan buenos momentos.

A mis amigos que han soportado algún que otro rollo acerca del “bitter pit” sin tener muy claro que es lo que les pasaba a las manzanas.

A mis padres, hermana y abuelo, por la paciencia que han demostrado aguantando el mal humor que a veces provocan los lentos progresos, apoyando y confiando en mí desde el primer día, sintiéndose orgullosos de mi trabajo.

Por último, y no por ello menos importante, a Miguel Ángel, por estar ahí a pesar de la distancia en los malos momentos y no dejarme abandonar, sabiendo que lo que realizaba era importante para mí. Por tu apoyo y comprensión este trabajo es algo de los dos.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de diversos proyectos de investigación y entidades a las que deseo expresar mi gratitud, ya que a través de los cuales he podido, en parte, “sobrevivir”: Plan Nacional de I+D, AGF97-1219 y AGL2000-1698; y a un contrato CSIC-Altinco.

1. Introducción	1
1.1. El calcio en Plantas Superiores	3
1.1.1. Propiedades y estado natural	3
1.1.2. El calcio en el suelo	4
1.1.3. Transporte y Absorción de Calcio en la Planta	7
1.1.3.1. Interacción con otros iones	12
1.1.4. El Calcio en el fruto	16
1.1.5. Relación entre Calcio y Fitohormonas	19
1.1.6. Las Auxinas	19
1.1.6.1. Biosíntesis y Metabolismo de auxinas	20
1.1.6.2. Distribución y transporte de auxinas	21
1.1.6.3. Funciones de las auxinas	22
1.1.7. El Calcio en la célula	23
1.1.7.1. Transducción de señales	24
1.1.7.2. Proteínas implicadas en la transducción de señales	30
1.1.7.2.1 Calmodulina	31
1.1.7.2.2 Proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPK)	33
1.2. Alteraciones de las plantas inducidas por la deficiencia de calcio.	34
1.2.1. Inhibición del crecimiento	35
1.2.2. Alteraciones fisiológicas	36
1.2.3. Fisiopatías de los frutos relacionadas con el Calcio	37
1.3. Bitter Pit	38
1.3.1. Posibles Causas del bitter pit	41
1.3.2. Factores implicados en el desarrollo del bitter pit	43
1.3.2.1. Contenido mineral del fruto	43
1.3.2.2. Carga de cosecha y crecimiento vegetativo	45

1.3.2.3.	Patrón	46
1.3.2.4.	Reguladores de crecimiento	47
1.3.2.5.	Balance hídrico	48
1.3.2.6.	Prácticas culturales	48
1.3.2.7.	Recolección del fruto	49
1.3.2.8.	Prácticas post-cosecha	49
1.3.3.	Diagnóstico y corrección del Bitter Pit	52
2.	Objetivos	56
3.		59
3.1.	Material vegetal (manzano)	61
3.1.1.	Patrón y variedad	65
3.1.2.	Prácticas culturales	67
3.1.3.	Características del suelo	68
3.2.	Localización del ensayo y diseño experimental	69
3.2.1.	Localización	69
3.2.2.	Tratamientos y diseño Experimental	70
3.2.2.1.	1997	70
3.2.2.2.	1998	71
3.2.2.3.	1999	73
3.3.	Toma y preparación de muestras	73
3.3.1.	Hojas	73
3.3.2.	Frutos	74
3.3.3.	Muestreo de regiones concretas de fruto.	74
3.3.3.1.	En el plano ecuatorial	74
3.3.3.2.	En el eje longitudinal	75
3.4.	Extracción de compuestos hidrosolubles	76

3.5. Métodos de calcinación y digestión	77
3.5.1. Calcinación de Hojas y Frutos	77
3.5.2. Digestión de Tejidos de Fruto	78
3.5.3. Digestión por microondas	78
3.6. Medidas biométricas	79
3.6.1. Peso seco y fresco de hojas	79
3.6.2. Dinámica del crecimiento	80
3.6.3. Sección de tronco	82
3.7. Parámetros de calidad del fruto	82
3.7.1. Carbohidratos totales por refractometría	82
3.7.2. Tamaño del fruto	83
3.8. Determinación cualitativa de calcio en el tejido del fruto	83
3.9. Determinación de clorofila	86
3.9.1. Extracción de pigmentos.	86
3.9.2. Separación y cuantificación de pigmentos por HPLC	86
3.9.3. Ecuaciones para la cuantificación de pigmentos	87
3.9.4. Estimación de clorofila por unidad de área mediante SPAD.	87
3.10. Análisis mineral en hoja y fruto	88
3.10.1. Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu, por espectrofotometría de absorción atómica	89
3.10.2. K por emisión atómica	89
3.10.3. Nitrógeno por el método Dumas	90
3.10.4. Determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl	90
3.10.5. P por colorimetría	91
3.11. Interpretación del análisis nutricional: Desviación del óptimo nutricional porcentual (DOP)	92

3.12. Determinación de iones en fruto por Electroforesis Capilar	93
3.12.1. Fundamentos de la Electroforesis Capilar _____	94
3.12.2. Método de análisis para especies catiónicas _____	96
3.12.3. Método de análisis para especies aniónicas _____	97
3.13. Análisis de datos _____	98
4. Resultados y Discusión _____	99
4.1. Parámetros de cosecha, morfológicos y de calidad de las manzanas Golden de Quinto de Ebro _____	101
4.1.1. Análisis de crecimiento de fruto _____	103
4.1.2. Sólidos solubles _____	107
4.1.3. Relación entre sólidos solubles y SPAD _____	109
4.2. Estatus nutricional de la plantación _____	111
4.2.1. Diagnóstico nutricional a partir del análisis de hoja. ____	112
4.2.2. Diagnóstico nutricional a partir del análisis de fruto ____	114
4.3. Evolución de nutrientes en 3 ciclos de cultivo _____	118
4.3.1. Elementos minerales en hoja _____	118
4.3.1.1. Macronutrientes _____	118
4.3.1.2. Calcio _____	121
4.3.1.3. Micronutrientes _____	123
4.3.2. Relaciones entre nutrientes _____	128
4.3.3. Elementos minerales en Fruto _____	131
4.3.3.1. Macronutrientes _____	131
4.3.3.2. Calcio _____	134
4.3.3.3. Micronutrientes _____	136
4.3.3.4. Relaciones entre nutrientes _____	137
4.3.3.5. Tasa de acumulación de nutrientes en fruto ____	140

4.4. Análisis floral	148
4.4.1. Diferenciación varietal	150
4.4.2. Estudio según el tipo de flor	151
4.4.3. Composición de las flores en distintos años	153
4.4.4. Flor como punto de inicio en hoja y fruto	154
4.4.5. Comparación de las pendientes de las rectas de tasa de acumulación con y sin flores.	157
4.5. Detección visual de calcio en manzana	160
4.6. Caracterización química de las zonas afectadas por bitter-pit	163
4.6.1. Composición aniónica	167
4.6.2. Composición catiónica	169
4.7. Caracterización química de distintas partes de una manzana	176
4.7.1. Análisis de epidermis	177
4.7.1.1. Composición aniónica	178
4.7.1.2. Composición catiónica	179
4.7.2. Análisis de semillas	182
4.7.2.1. Composición aniónica	182
4.7.2.2. Composición catiónica	183
4.7.3. Análisis de pedúnculos	185
4.7.3.1. Composición aniónica	186
4.7.3.2. Composición catiónica	187
4.8. Distribución espacial de nutrientes en manzanas	188
4.8.1. Gradiente longitudinal de aniones	189
4.8.2. Gradiente transversal de aniones	193
4.8.2.1. Fosfato	195

4.8.2.2.	Citrato _____	196
4.8.2.3.	Malato _____	196
4.8.2.4.	Quinato _____	197
4.8.2.5.	Lactato _____	198
4.8.3.	Gradiente longitudinal de cationes _____	199
4.8.4.	Gradiente transversal de cationes _____	204
4.8.4.1.	Calcio _____	204
4.8.4.2.	Magnesio _____	206
4.8.4.3.	Potasio _____	207
4.9.	Consideraciones Finales _____	211
5.	<i>Conclusiones</i> _____	220
6.	<i>Bibliografía</i> _____	227
7.	<i>Anexo</i> _____	249

Indice de Tablas

<i>Tabla 1: Diseño experimental en 1997</i>	70
<i>Tabla 2: Diseño experimental en 1998</i>	72
<i>Tabla 3: Longitudes de onda de los distintos elementos</i>	89
<i>Tabla 4: Indicadores de producción y productividad en manzanos de la variedad Golden Smoothie (densidad de plantación 1250 árboles x ha⁻¹) en los tres años de experimentación.</i>	102
<i>Tabla 5: Ecuaciones logísticas de crecimiento</i>	105
<i>Tabla 6: Valor máximo de crecimiento, tiempo de máximo crecimiento y tasa de máximo crecimiento para el peso fresco y seco del fruto</i>	106
<i>Tabla 7: Valores de referencia óptimos en hoja de manzano. Los datos mostrados son el promedio de los recopilados por Gagnard (1987).</i>	113
<i>Tabla 8: Nutrientes en hoja de manzano a 75-105 DTPF, en los tres años estudiados</i>	113
<i>Tabla 9: Índices DOP de los elementos analizados en hojas</i>	114
<i>Tabla 10: Análisis de 9 variedades de manzana de alta calidad y excelente capacidad de conservación. Los datos son el promedio de 5 réplicas y los resultados se expresan, sobre la base de materia seca, en g 100g⁻¹ para macroelementos y mg kg⁻¹ para microelementos.</i>	115
<i>Tabla 11: Valores obtenidos en cosecha del análisis de frutos estudiados</i>	116
<i>Tabla 12: Índices DOP de los macronutrientes analizados en fruto a partir de las referencias obtenidos de manzanas comerciales en perfecto estado de conservación</i>	117
<i>Tabla 13: Relaciones entre nutrientes de interés, en el fruto de la cosecha de 1997</i>	138

<i>Tabla 14: Tasa de acumulación de nutrientes en manzanas (mg g^{-1} de materia seca, para los macro, y $\mu\text{g g}^{-1}$ para los micronutrientes). Los datos corresponden a dos ciclos de desarrollo (años 1998 y 1999). Entre paréntesis se muestran los coeficientes de correlación de las rectas, $p < 0.01$</i>	<i>146</i>
<i>Tabla 15: Composición nutricional de las flores de cuatro variedades distintas.</i>	<i>151</i>
<i>Tabla 16: Composición nutricional de flores reina y no-reina en dos localidades.</i>	<i>151</i>
<i>Tabla 17: Comparación del contenido de nutrientes en flor durante dos años consecutivos. Las medias aparecen seguidas del error típico</i>	<i>154</i>
<i>Tabla 18: Comparación de las tasas de acumulación de nutrientes considerando o no los datos de flor.</i>	<i>157</i>
<i>Tabla 19. Humedad contenida en la piel peduncular y calícina de las zonas sanas y afectadas por bitter pit</i>	<i>178</i>

Indice de Figuras

Figura 1. Intercambio calcio-protón en las micelas de arcilla del suelo	5
Figura 2: Estructura propuesta por Henglein (1958) para la protopectina.....	8
Figura 3: Representación esquemática del transporte del calcio por la planta (Maarschner, 1995)	11
Figura 4: Representación de la absorción de calcio en manzanas (Faust y Shear, 1971)	17
Figura 5: Posibles rutas metabólicas de la síntesis de IAA.....	21
Figura 6: Señales que afectan al desarrollo de las planta. (A) externas; (B) internas.....	24
Figura 7: Interacciones de Ca ²⁺ intra y extracelular en la regulación celular	27
Figura 8: Distribución de Ca ²⁺ en el citoplasma en la proximidades de los canales abiertos de Ca ²⁺	28
Figura 9: Diagrama esquemático de los diferentes canales de Ca ²⁺ en plantas superiores (Schroeder y Thuleau, 1991).	29
Figura 10: Localización y movilización de calcio durante la transducción en la célula (reproducción con permiso de los autores; Rudd y Franklin-Tong, 1999)	30
Figura 11: Estructura de la Calmodulina. (A) sin acomplejar (B) complejo Ca ²⁺ /calmodulina..	32
Figura 12: Deficiencias de Calcio en distintos cultivos	34
Figura 13: Manzana con bitter pit	39
Figura 14: Parte de un manzano: (A) sección logitudinal de la flor (B) sección longitudinal del fruto	62
Figura 15: Variedad de manzano Golden Smoothee injertado sobre el patrón M9 de la serie East Malling Merton.....	66

Figura 16: Localización de Quinto de Ebro, término donde se ubica la finca El Cerradico	69
Figura 17: Corte transversal de una manzana y representación de las muestras tomadas para caracterizar los posibles gradientes transversales.	75
Figura 18: Corte longitudinal de una manzana y representación de las muestras tomadas para caracterizar los posibles gradientes transversales.	75
Figura 19: Esquema del proceso de una extracción de material hidrosoluble.....	76
Figura 20: La primera fase del crecimiento de las plantas tiende a ser exponencial (curva A) aunque el modelo sigmoideo representa más adecuadamente el total del ciclo de la planta (curva B). (Leopold y Kriedemann, 1975)	81
Figura 21: Aplicación del reactivo	85
Figura 22: Filtro impregnado y corte transversal de la manzana	85
Figura 23: Manzana sobre el papel de filtro	85
Figura 24: Tinción de las zonas con presencia de Ca ²⁺	85
Figura 25: Aspecto del papel de filtro una vez seco.....	85
Figura 26: Curvas de calibración del SPAD por HPLC y por espectrofotometría para manzano	88
Figura 27: Curvas de crecimiento del peso fresco y seco del fruto	104
Figura 28: Evolución de azúcares (°Brix) en fruto durante los 3 años del estudio.....	108
Figura 29: Relación entre clorofila foliar y sólidos solubles en fruto	109
Figura 30: Ajuste a una sola recta la relación de los 3 años entre clorofila y azúcares.	110
Figura 31: Evolución de la concentración foliar de macronutrientes durante los tres años del experimento (% de materia seca).....	119
Figura 32: Evolución de calcio (% de materia seca) en hoja.....	122
Figura 33: Evolución de micronutrientes en hoja (mg kg ⁻¹ de materia seca)....	124

Figura 34. Hojas de manzano Golden Smoothee afectadas por deficiencia de Mn. Finca El Cerradico, Quinto de Ebro, Zaragoza.....	125
Figura 35. Hojas de manzano Golden Smoothee afectadas por deficiencia de Zn. Finca El Cerradico, Quinto de Ebro, Zaragoza.....	126
Figura 36: Evolución de alguna de las relaciones de interés entre nutrientes foliares.....	129
Figura 37: Evolución de macronutrientes (% de materia seca) en fruto	132
Figura 39: Evolución de micronutrientes (% de materia seca) en fruto.....	135
Figura 40: Evolución de las relaciones estudiadas en fruto	137
Figura 41: Tasa de incorporación de calcio al fruto en función de la masa del mismo	139
Figura 42: Tasa de acumulación de micronutrientes para 1998 y 1999.....	141
Figura 43 Tasa de acumulación de macronutrientes para 1998 y 1999	142
Figura 44: Evolución de macro y micronutrientes en fruto durante dos años consecutivos tomando como punto de inicio el dato de análisis floral	152
Figura 45: Evolución de macro y micronutrientes en hoja durante dos años consecutivos tomando como punto de inicio el dato de análisis floral	153
Figura 46. Evolución del contenido en calcio por unidad de peso seco (A) y por fruto (B), en función de los días tras la plena floración o del peso seco del fruto.....	156
Figura 47: Tinción específica de calcio en distintas superficies de una manzana afectada por bitter-pit. En la parte superior se observa el aspecto externo del fruto y, en las inferiores, cortes transversales y longitudinal.....	158

Figura 48: Tinción específica de calcio en distintas superficies de una manzana sana. En la parte superior se observa el aspecto externo del fruto y, en las inferiores, cortes transversales y longitudinales.....	159
Figura 49: Electroferogramas de aniones y cationes en un extracto acuoso de manzana. En las gráficas se muestra la identificación de los elementos o moléculas mayoritarios.....	162
Figura 50: Electroferogramas de aniones de tres tipos de tejidos de manzana: bitter-pit, zona sana adyacente, y pulpa de manzanas sanas.	163
Figura 51: Composición aniónica de tres tipos de tejidos de manzana: bitter-pit, zona sana adyacente, y pulpa de manzanas sanas. Los datos son el promedio de 10 experimentos \pm el error típico.....	164
Figura 52: Electroferogramas de cationes de tres tejidos de manzana: bitter-pit, zona sana adyacente, y pulpa de manzanas sanas.	166
Figura 53: Composición en Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} solubles en agua, de tres tejidos de manzana: bitter-pit, zona sana adyacente, y pulpa de manzanas sanas. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes \pm error típico.....	167
Figura 54: Composición en Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} insolubles en agua, de tres tejidos de manzana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes \pm error típico.	168
Figura 55: Contribución de cada una de las dos formas de Ca^{2+} (soluble e insoluble) al total de su concentración en los tres tejidos.	169
Figura 56: Contribución de cada una de las dos formas de Mg^{2+} (soluble e insoluble) al total de su concentración en los tres tejidos.....	170
Figura 57: Contribución de cada una de las dos formas de K^{+} (soluble e insoluble) al total de su concentración en los tres tejidos.....	171

Figura 58: Composición aniónica de distintas zonas de piel de manzana: bitter pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos. La barra de error corresponde al error típico.....	174
Figura 59: Composición en Ca ²⁺ , Mg ²⁺ y K ⁺ solubles en agua, de distintas zonas de piel de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde al error típico.....	175
Figura 60: Composición en Ca ²⁺ , Mg ²⁺ y K ⁺ insolubles en agua, de distintas zonas de piel de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde al error típico.....	176
Figura 61: Composición aniónica de semillas de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica.....	178
Figura 62: Composición en Ca ²⁺ , Mg ²⁺ y K ⁺ solubles en agua, de semillas de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica.....	179
Figura 63: Composición en Ca ²⁺ , Mg ²⁺ y K ⁺ insolubles en agua, de semillas de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica.....	180
Figura 64: Composición aniónica de pedúnculos de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica.....	181

Figura 65: Composición en Ca ²⁺ , Mg ²⁺ y K ⁺ solubles en agua, de pedunculos de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica.	182
Figura 66: Composición en Ca ²⁺ , Mg ²⁺ y K ⁺ insolubles en agua, de pedúnculos de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica	183
Figura 67: Gradiente de aniones en la zona longitudinal de la manzana. Los resultados son el promedio de 10 frutos ± error típico.	185
Figura 68: Aplicación del algoritmo de interpolación en una tabla Excel	188
Figura 69: Aplicación del algoritmo de interpolación en un caso real. Los valores en color azul son los obtenidos del análisis y, en naranja los calculados	188
Figura 70: Representación de la concentración de fosfato en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de una afectada por bitter pit.....	189
Figura 71: Representación de la concentración de citrato en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de una afectada por bitter pit.....	190
Figura 72: Representación de la concentración de malato en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de una afectada por bitter pit.....	191
Figura 73: Representación de la concentración de quinato en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de una afectada por bitter pit.....	192
Figura 74: Representación de la concentración de lactato en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de una afectada por bitter pit.....	193
Figura 75: Gradiente longitudinal de cationes, solubles e insolubles en agua, de manzanas sanas y afectadas por bitter pit. Los resultados son el promedio de 10 frutos ± error típico.....	194

Figura 76: Representación de la concentración del calcio soluble e insoluble en agua, en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de otra afectada por bitter-pit.	198
Figura 77: Representación de la concentración del magnesio soluble e insoluble en agua, en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de otra afectada por bitter-pit.	200
Figura 78: Representación de la concentración del potasio soluble e insoluble en agua, en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de otra afectada por bitter-pit.	202
Figura 79: Corte y tinción específica de calcio, de una zona de manzana afectada por bitter pit.	209
Figura 80: Detalle de tejido sano (A) y afectado por bitter pit (B), tras tinción específica de calcio.....	209

1. Introducción

1.1. El calcio en Plantas Superiores

1.1.1. Propiedades y estado natural

El calcio es un elemento metálico, reactivo y blanco plateado. Pertenece al grupo 2 (o II A) del sistema periódico, y es uno de los metales alcalinotérreos. Su número atómico es 20 y fue aislado la primera vez por el químico británico Humpry Davy en 1808 mediante electrólisis. Es un catión divalente, que tiene seis isótopos estables y varios radiactivos. Metal maleable y dúctil, amarillea rápidamente al contacto con el aire. Tiene un radio iónico hidratado de 0,412 nm, presenta un punto de fusión de 839°C, un punto de ebullición de 1484°C y una densidad de 1,54 g/cm³; su masa atómica es 40,08.

Es uno de los elementos más abundantes en la litosfera, ocupando el quinto lugar en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre, pero no se encuentra en estado puro en la naturaleza. Se da en varios compuestos muy útiles, tales como el carbonato de calcio (CaCO₃), del que están formados la calcita, el mármol, la piedra caliza y la marga; el sulfato de calcio (CaSO₄), presente en el alabastro o el yeso; el fluoruro de calcio (CaF₂), en la fluorita; el fosfato de calcio

o roca de fosfato ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), y varios silicatos. En el aire frío y seco, el calcio no es fácilmente atacado por el oxígeno, pero al calentarse, reacciona fácilmente con los halógenos, el oxígeno, el azufre, el fósforo, el hidrógeno y el nitrógeno. El calcio reacciona violentamente con el agua, formando el hidróxido $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y liberando hidrógeno.

1.1.2. El calcio en el suelo

Como elemento nutritivo, el calcio es el catión más abundante en el complejo de cambio, pero la proporción que se asimila depende del grado de saturación del suelo. El calcio fijado en el complejo coloidal y el unido a los compuestos húmicos son las formas naturales más abundantes del horizonte fértil. Incluso en suelos ácidos casi siempre hay cantidades suficientes para la adecuada nutrición de las plantas cultivadas, sobre todo cuando las especies son poco exigentes. En general, para regiones templadas y húmedas, el calcio intercambiable es unas diez veces más abundante que el potasio cambiante. Sin embargo, en su mayor parte, se halla como no intercambiable, formando parte de los minerales como la anortita ($\text{CaAl}_2\text{-Si}_2\text{O}_8$), aunque paulatinamente se puede hacer disponible por descomposición del mineral. Los suelos áridos y semiáridos contienen cantidades apreciables de calcita (CaCO_3); y los alcalinos de fosfatos cálcicos más o menos solubles dependiendo de la acidez y producto de solubilidad de la sal. Así, los iones calcio, pueden reaccionar con los iones fosfato del suelo formando precipitados de distinta solubilidad (Jackobsen 1993b):



El contenido de iones totales en la solución del suelo varía, pero, en la mayoría de los casos, el Ca^{2+} constituye el 60-80 % del total de estos iones y, aunque las raíces aprovechan menos del 3% del calcio disponible, esta cantidad

suele ser suficiente para satisfacer las demandas que, por ejemplo, tienen los frutales (Barber et al., 1963).

Calcio y magnesio constituyen la fracción más importante del complejo de cambio catiónico, en tanto que los cationes monovalentes se hallan en menor proporción. Entre estos últimos, el potasio está retenido más fuertemente que el sodio por lo que su lixiviado es escaso y su nivel en los suelos regularmente fertilizados, suele ser elevado. Incluso a lo largo del tiempo, puede provocarse un enriquecimiento en potasio, con el consiguiente efecto antagónico sobre la toma de calcio y de magnesio por las raíces. De acuerdo con los resultados obtenidos por Jackobsen (1993a), el antagonismo potasio-calcio se hace particularmente evidente cuando, durante el crecimiento del fruto, el valor de la relación entre ambos nutrientes en el extracto acuoso del suelo (1:2) es superior a 10.

El calcio se halla también asociado a la materia orgánica del suelo, en relación con el humus, aunque la mayor parte se encuentra adsorbido en las partículas de arcilla

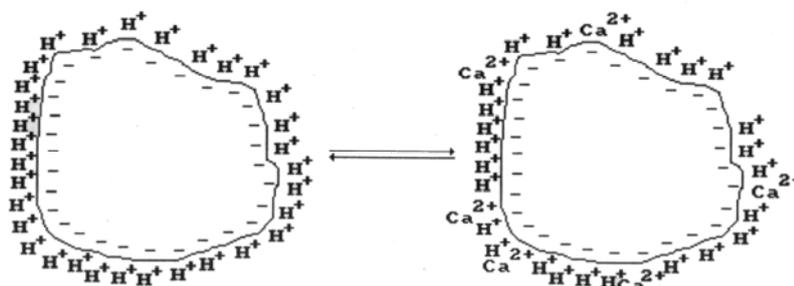


Figura 1. Intercambio calcio-protón en las micelas de arcilla del suelo

Las micelas de arcilla (*Figura 1*) tienen forma de discos irregulares con la superficie cargada negativamente. Estas cargas atraen a iones como H^+ y Ca^{2+} , que quedan, de este modo, adsorbidos en la superficie en una reacción reversible.

Esta disponibilidad disminuye en condiciones muy alcalinas al hacerse

insolubles los compuestos de Ca^{2+} . En suelos ácidos las sales de calcio y magnesio están disociadas y por lo tanto se produce la lixiviación de estos cationes divalentes. Por ello, es lógico que su disponibilidad aumente con el pH; aunque por encima de pH 8.5 existe una reducción importante ya que, sodio y potasio reemplazan calcio y magnesio en los cristales de arcilla y estos cationes divalentes precipitan como carbonatos.

Los suelos muy ácidos suelen ser pobres y con escasa capacidad de intercambio, estando equilibradas las cargas negativas de las arcillas con H^+ . Para fertilizar este tipo de suelos, escasos en nuestro país, donde el problema suele ser más bien el contrario, se suele proceder a un encalado con CaCO_3 o CaO , de modo que los protones son desplazados y forman agua, aumentándose, por consiguiente, la capacidad de intercambio. Por otra parte, es importante controlar cuidadosamente el pH para que no rebase el valor de 7 (Gil-Martínez, 1995).

Las funciones del calcio en el suelo son muy diversas y, desde el punto de vista químico, se podría destacar que es el encargado de neutralizar la acidez del suelo aumentando el pH, incrementa el porcentaje de saturación de bases, y participa en los mecanismos de intercambio catiónico entre la solución y el complejo de intercambio catiónico, además de elevar el potencial redox.

El calcio es antagonista de algunos elementos, como K, Fe, Mn, B y Zn dificultando su asimilación y reduciendo la toxicidad de Mn, B, Zn (Sillampaa, 1976). Desde un punto de vista edafológico cabría destacar que: favorece la estabilidad estructural del suelo, y también los mecanismos de difusión gaseosa atmósfera-suelo; y permite la circulación del agua, ya que impide la destrucción de agregados y el taponamiento de los poros del suelo.

Atendiendo a la actividad fisiológica del calcio podría establecerse que: facilita la respiración radicular, favorece la evolución de la materia orgánica en el suelo mediante procesos de humificación o mineralización, estimula la actividad

de organismos nitro fijadores, y reduce la virulencia de algunas de las enfermedades criptogámicas (Fuentes, 1997).

1.1.3. Transporte y Absorción de Calcio en la Planta

Sprengel fue el primer investigador en mostrar que el calcio es un nutriente esencial para las plantas, que está inmovilizado formando sales de ácidos orgánicos e inorgánicos (Bergmann, 1992).

Las alteraciones fisiológicas asociadas con la nutrición cálcica son factores importantes para los cultivos. De hecho, según (Poovaiah, 1993), al aumentar la concentración de calcio en tejidos vegetales debería disminuir la incidencia de estas fisiopatías y, por tanto, mejorar la calidad del producto. Sin embargo, niveles de calcio bajos en determinados órganos de una planta no siempre son el resultado de una absorción de calcio insuficiente, sino que puede deberse a problemas de distribución (Paiva et al., 1998).

La necesidad de calcio de los cultivos agrícolas depende de la familia, género y especie considerada, así como de factores medioambientales como el suelo y las condiciones climáticas. Según Yamada (1975) una concentración foliar de calcio de 0.5% en la materia seca se considera un nivel adecuado para la mayoría de las plantas, aunque las leguminosas tienen requerimientos cinco veces mayores (Kamprath y Foy, 1971). Las cantidades de calcio absorbidas del suelo varían entre 10 y 100 kg ha⁻¹. Así, en la mayor parte de los casos, la concentración de Ca²⁺ en tejidos vegetales es superior a la considerada como óptima.

La necesidad del calcio en el caso del manzano, calculando una producción anual de 5-6 toneladas de materia seca por hectárea, podría estimarse en unos 25 kg ha⁻¹ que se distribuirían de la siguiente manera: 1.20 % en la materia seca de raíces y tallos, 0.60% en ramas, 0.90% en hojas y 0.02% en fruto (Vang-Petersen, 1980).

El calcio que está presente en las paredes celulares, en forma de pectatos cálcicos, parece estar involucrado en la absorción de iones y mantenimiento de la permeabilidad de la membrana (Simon, 1978). Su presencia en ella es esencial para mantener las estructuras, ya que su disminución o ausencia provoca, entre otros efectos, despolarización del potencial transmembrana (Gil-Martínez, 1995).

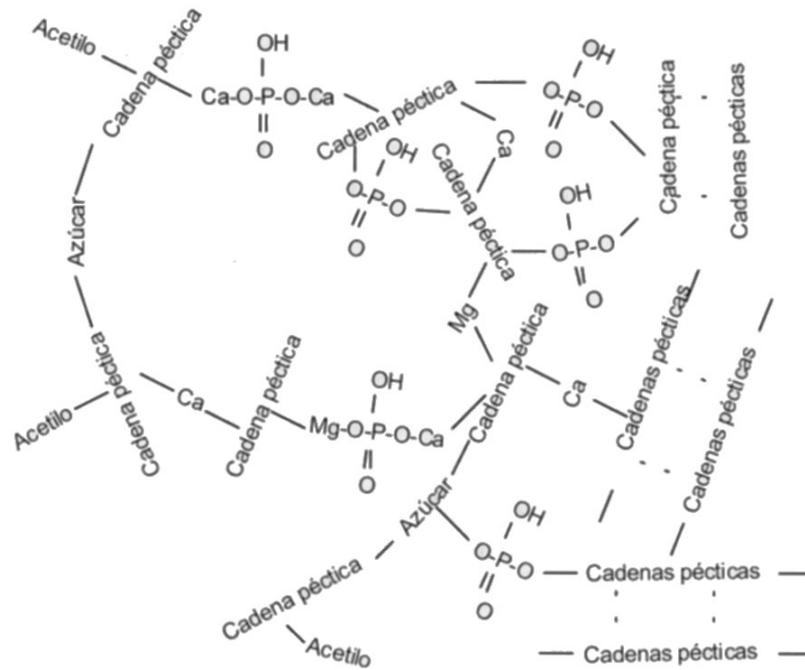


Figura 1: Estructura propuesta por Henglein (1958) para la protopectina

Una de las principales funciones del calcio en la planta es la de actuar, formando parte de la estructura de la protopectina, como agente cementante para mantener las células unidas. La protopectina (*Figura 1*) está localizada en la lámina media y en la pared primaria celular; cuando se degrada se originan productos más simples, principalmente pectatos cálcicos insolubles. Esta función parece tener particular importancia, puesto que si el calcio se remplazase por otros elementos esenciales, tales como potasio o magnesio, los compuestos orgánicos y

las sales minerales no se retendrían por las membranas en la forma más adecuada (Navarro y Navarro, 2000).

Otras funciones atribuidas al calcio son: regular la absorción de nitrógeno; actuar sobre la traslocación de los hidratos de carbono y proteínas en el interior de la planta; neutralizar los ácidos orgánicos que se pueden originar en el metabolismo vegetal, tal cual ocurre con el ácido oxálico. Esto implica que interviene en la regulación del pH celular y en su osmorregulación; activando enzimas como amilasa y fosfolipasa. También se ha descrito que regula la absorción o contrarresta los efectos perjudiciales del exceso de otros elementos como potasio, sodio o magnesio (Hanson, 1984).

Los excesos de calcio pueden inmovilizarse en forma de cristales de oxalato de calcio (Marschner, 1995). Estos cristales se encuentran en los tallos y peciolo (Terblanche et al., 1979). Así, la movilidad del calcio podría estar sujeta a restricciones fisiológicas que limitan su absorción durante el desarrollo del fruto (Swietlik y Faust, 1984). Por otro lado, el calcio es muy poco tóxico para los vegetales, de modo que concentraciones muy altas suelen provocar pocos efectos negativos.

El calcio es poco móvil y tiende a acumularse en los órganos más viejos, mientras que los de mayor actividad metabólica (hojas en crecimiento, flores, frutos y meristemos apicales) son los que necesitan un mayor aporte; por tanto, la deficiencia de este macronutriente afecta en primer lugar a las partes en formación y meristemos en crecimiento, donde queda fijado y prácticamente inmóvil en sus paredes celulares. Debido a esta inmovilidad, las hojas viejas pueden tener concentraciones normales de calcio, mientras que las hojas jóvenes, frutos u otros órganos pueden presentar niveles por debajo de la normalidad (Chiu y Bould, 1977).

El movimiento del calcio es unidireccional, ascendiendo desde las raíces

hacia las zonas meristemáticas y los tejidos jóvenes. Una vez depositado en el tejido foliar no recircula, incluso bajo condiciones de estrés cálcico (Hanger, 1979).

La movilidad del calcio es mucho mayor en la compartimentación extracelular de la planta, constituida por el apoplasto (conjunto de paredes celulares, incluidas las células del xilema) que en la compartimentación intracelular o simplasto, comunidad de protoplastos vivos, incluidos los tubos del floema (Marschner, 1983).

La toma de calcio por las plantas está influenciada por su estado redox, por el pH del suelo y por la concentración de otros cationes, además de estar relacionado con sus funciones en la pared celular, respiración, fotosíntesis, transpiración y efectos específicos (antagonismo y/o sinergismo) de otros iones. Las plantas lo absorben únicamente en forma iónica y es transportado hacia la parte aérea de la planta por el flujo de transpiración a través del xilema. A diferencia de K^+ y Mg^{2+} , iones que, como el nitrógeno y los compuestos de fósforo, son fácilmente transportados en el floema (Tagliavini et al., 2000); los iones calcio y boro, son transportados exclusivamente a través de los vasos del xilema (Bergmann 1992), bien en forma iónica o acompañado con los ácidos málico o cítrico (Vang-Peterson, 1980).

De acuerdo con Fried y Shapiro (1961), la concentración de calcio en la mayoría de las soluciones del suelo varía entre 3,4 y 14 mM mientras que en la superficie de la raíz es de 0,1-1 mM siempre que no se den excesos de otros iones. Así para que los minerales del suelo sean absorbidos por las plantas deben, en primer lugar, pasar de la solución del suelo al interior de las células de la raíz. El calcio absorbido atraviesa la epidermis, el parénquima cortical a través de los canales citoplasmáticos que conectan las células, la endodermis y el parénquima vascular, penetrando en los vasos leñosos del xilema encargados de conducir agua y sales por toda la planta.

Tras alcanzar la superficie de la raíz, el calcio se mueve pasivamente por el flujo de transpiración acompañando al agua (Kirby y Pilbearn, 1984). Este mecanismo se realiza a través de una serie de reacciones de intercambio iónico de calcio en las paredes cargadas negativamente de los vasos del xilema hacia las diferentes partes del vegetal. Es decir, la fuerza impulsora del movimiento del agua por el árbol es la evaporación a través de las hojas, y el calcio se arrastra por la corriente de transpiración (*Figura 2*). Si el potencial hídrico en el xilema disminuye, la acumulación y concentración de calcio en el fruto decrece (Bar-Tal et al., 1999). Si bien este mecanismo puede potenciarse por la presencia de otros cationes divalentes o por quelación del ión calcio.

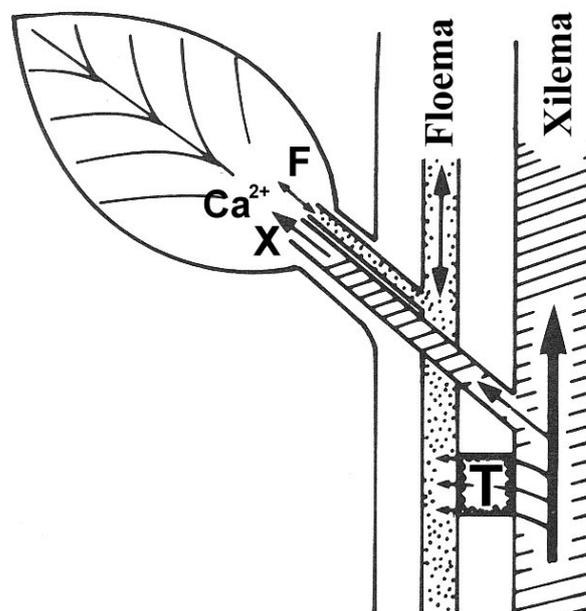


Figura 2: Representación esquemática del transporte del calcio por la planta (Maarschner, 1995)

El transporte del calcio a las hojas parece estar más relacionado con la tasa de crecimiento de las raíces que con la de los brotes (Scaife y Clarkson, 1978). El calcio es importante para el desarrollo de las raíces, ejerciendo una triple función: multiplicación y crecimiento celulares y neutralización de hidrogeniones (Navarro

y Navarro, 2000). Por otra parte, el calcio tiende a reducir la permeabilidad de las raíces jóvenes, provocando la expansión de éstas y también la de sus pelillos radiculares, lo que potencia una mayor eficacia en la exploración del suelo. Algunos investigadores consideran que la alteración del sistema radicular es un síntoma de la deficiencia de este elemento (Sanz et al., 2000).

Se han encontrado evidencias de una baja movilidad de calcio en el floema, que es el encargado de transportar los azúcares desde las hojas hacia los frutos en desarrollo (Bradfield, 1975; Ziegler, 1975). Esto se apoya, en las bajas concentraciones de Ca^{2+} encontradas en la savia del floema, en su falta de acumulación, y de traslocación cuando se aplica como tratamiento foliar, y en su escasa movilidad durante la senescencia foliar (Zimmerman, 1969). Sin embargo, en ocasiones, se ha podido comprobar cierto movimiento del calcio por el floema hacia zonas de gran desarrollo (gradiente fuente-sumidero muy elevado) o, en cotiledones, cuando el trayecto es muy corto y el gradiente grande (Gil-Martinez, 1995).

En plantas herbáceas, el calcio se inmoviliza rápidamente, mientras que, en leñosas, el movimiento ascendente del calcio es bajo, pero apreciable con mucha acumulación en la corteza y poca madera. Así, en manzano, el calcio continúa ascendiendo por el tronco a lo largo de la estación. Este calcio translocado secundariamente viene desde las reservas de la raíz y brotes más bajos, y es una fuente de calcio para el crecimiento de la planta en la siguiente estación (Hanger, 1979).

1.1.3.1. Interacción con otros iones

La interacción entre iones se define como la influencia que ejerce un ión (positiva o negativa) sobre la acumulación de otros iones en el mismo tejido (Emmert, 1959).

La interacción con otros iones puede influir en la absorción de calcio. Existe

una notable competición con cationes no-específicos (cationes antagónicos) como K^+ , Mg^{2+} y NH_4^+ que pueden disminuir su absorción (Bangerth, 1979).

El boro es un microelemento esencial para las plantas (Maschner, 1983) que regula un buen número de reacciones enzimáticas (transporte de azúcares, división y crecimiento celular, respiración, fotosíntesis y síntesis de paredes celulares), ya que tiene la capacidad de acomplejarse fácilmente. Cuando existe en cantidad suficiente, parece que provoca un incremento en la absorción de calcio (Wooldridge et al., 1974). Es transportado, al igual que el calcio, casi exclusivamente por los vasos del xilema. Shear y Faust (1970) indican que la cantidad de boro está muy relacionada con el bitter pit y que pequeñas aplicaciones son beneficiosas para combatir dicha fisiopatía. En cambio, si la concentración de este elemento es excesiva, se produce un efecto contrario al descrito (antagónico con el calcio). Así, Wojcik y Cieslinski (2000), encuentran que aplicaciones de boro, en manzano, tanto en aspersión foliar, como al suelo, incrementan la concentración final de boro y calcio en el fruto.

El fósforo, es un componente de ciertos enzimas y proteínas, de adenosin trifosfato (ATP), de ácido ribonucleico (ARN), ácido dexosirribonucleico (ADN), y fitina. Su función más importante es la de almacenamiento y transferencia de energía. La energía obtenida de la fotosíntesis y el metabolismo de los hidratos de carbono es almacenada en los compuestos fosforados para su posterior utilización en procesos reproductivos y de crecimiento (Tisdale et al., 1985).

El fósforo es muy móvil dentro de la planta y, al igual que el N, se desplaza a aquellos lugares en los que existe gran actividad metabólica (Rom, 1996). El fosfato a altos niveles, junto con el Ca^{2+} , forma precipitados insolubles de fosfato de calcio que obstruyen las conducciones y, por lo tanto, impiden el movimiento del Ca^{2+} desde la raíz hacia el brote (Chiu y Bould, 1976).

Las aplicaciones de fosfato amónico pueden aumentar el vigor del árbol, la

producción y, en algunos casos, la calidad de la fruta. Sin embargo, según Raese (1998), el exceso de abonado fosfatado a perales y manzanos, puede provocar la acidificación del suelo y un aumento de la incidencia de *bitter pit* en manzanas y de *cork spot* en peras.

El magnesio es de gran importancia por ser uno de los componentes de la molécula de clorofila pieza clave en el proceso de la fotosíntesis. Tiene una actividad química similar a la del calcio, y por ello compite con él en el árbol. Es transportado principalmente vía floema y según Lewis y Martín (1973), existe un gradiente de concentración en el fruto. Es posible que el Mg pueda afectar a la absorción y translocación de calcio (Kotze, 1979) y que pueda reemplazar el calcio de las sustancias pécticas de la pared celular dando lugar a una pérdida de rigidez. Su aplicación vía foliar o al suelo, también disminuye la concentración de calcio en hojas y raíces (Vang-Petersen, 1980). De hecho, infiltraciones realizadas con $MgCl_2$ en manzano inducen la aparición de bitter pit (Burmeister y Dilley, 1993; Retamales et al., 2000).

El nitrógeno que, participa en la estructura de las moléculas proteicas, es transportado, principalmente, vía floema, tiene una marcada influencia sobre el movimiento y distribución del calcio. Cuando se aporta el nitrógeno en forma amoniacal al medio nutritivo se produce una reducción en la absorción y movimiento del calcio, a la vez que aumenta la concentración en las hojas jóvenes (Shear y Faust, 1970; Fukumoto y Nagai, 1983). En cambio, cuando el aporte se realiza en forma de nitrato, aumenta la absorción de calcio y su almacenamiento en las hojas, y cuando se suministra a manzanos en otoño se produce una acumulación de calcio en los brotes (Ludders et al., 1970). La nutrición de plantas con nitrato produce contenidos en ácidos orgánicos más altos que cuando se fertiliza con amonio (Kirby y Mengel, 1976). En cualquier caso, desde un punto de vista agronómico, los excesos de nitrógeno, no son recomendables ya que favorecen el crecimiento de los brotes sobre el de los frutos; concretamente, en

manzana y melocotón, su calidad aumenta cuando la concentración de nitrógeno en fruto es muy baja y alta la de calcio (Tagliavini, et al., 2000).

El potasio, es un elemento esencial para las plantas que desempeña multitud de funciones entre las que destacan su papel cómo osmolito para mantener la turgencia celular. Juega un importante papel en el metabolismo de los hidratos de carbono, favoreciendo la producción y transporte de azúcares, almidón y ácidos (Missotten, 1996). Además, es antagonista del calcio en la transpiración y retrasa su absorción; por lo tanto el contenido de calcio está correlacionado negativamente con el aporte de potasio, tanto en hoja como en fruto (Van-Petersen, 1973). La relación de equilibrio entre ambos cationes varía con la especie e incluso entre variedades.

Este catión es transportado principalmente vía floema en forma iónica. Transporte que se produce de forma lineal con el crecimiento del fruto. A diferencia del calcio, su concentración es bastante uniforme dentro el fruto. Asimismo, algunos parámetros indicadores de calidad, como la concentración de carbohidratos solubles, se relacionan positivamente con el contenido de potasio en fruto (Tagliavini, et al., 2000).

Los micronutrientes u oligoelementos son fundamentalmente constituyentes de moléculas enzimáticas y por lo tanto están presentes sólo en cantidades muy pequeñas. Estos oligoelementos esenciales están íntimamente implicados en prácticamente todos los procesos metabólicos. Actúan como cofactores y activadores de reacciones enzimáticas o ejercen como catalizadores cuando son grupos prostéticos de proteínas metálicas. La mayor parte de estos átomos metálicos son metales de transición y realizan su acción catalítica por cambio en su estado de valencia. Así el hierro es un componente de varios transportadores de electrones como citocromos o ferredoxina. Es esencial en la respiración y Fotosíntesis por su capacidad para cambio en su estado de oxidoreducción. Además, aunque no es un componente de la clorofila, es esencial para su síntesis;

el manganeso es activador de varias enzimas y también actúa en la liberación fotosintética de oxígeno; el cobre forma parte de varios sistemas enzimáticos como la ácido ascórbico oxidasa y citocromo oxidasa, y de la plastocianina que se localiza en la cadena de transporte electrónico fotosintético. Por otra parte su deficiencia inhibe la lignificación de la pared celular; y, el cinc actúa como activador o formando parte de varias enzimas como la anhidrasa carbónica y su deficiencia produce un descenso en la producción de auxinas. Kabata-Pendias y Pendias (1992) resumen las relaciones antagonistas o de sinergismo entre calcio y micronutrientes. Así, el calcio juega un papel clave en la absorción y metabolismo de elementos traza como: B, Cu, Fe, Mn y Zn, entre otros.

1.1.4. El Calcio en el fruto

Mientras que la toma de algunos macroelementos por parte del fruto se realiza de forma continuada, permaneciendo metabólicamente activos durante la vida del mismo, análisis de calcio realizados en manzanas, con distinto grado de maduración, han demostrado que el paso de calcio al fruto se realiza en dos fases (*Figura 3*):

1. Periodo comprendido desde la floración hasta el cuajado, cuando el fruto crece rápidamente y la absorción de calcio es rápida y lineal. Conforme el elemento llega al fruto (a través del xilema) se va acumulando, hasta que se produce un cambio metabólico que coincide con el fin de la división celular y el comienzo de la elongación. Quilan (1969) encontró que el fruto acumula el 90% del total de calcio en la 6 primeras semanas de crecimiento.
2. Periodo que finaliza en la recolección. Entrada y salida de calcio en el fruto, donde su concentración aumenta muy poco o permanece prácticamente constante, y el aporte de agua se realiza entonces a través del

floema donde, como ya se ha comentado, la concentración de calcio es muy baja (Link, 1976).

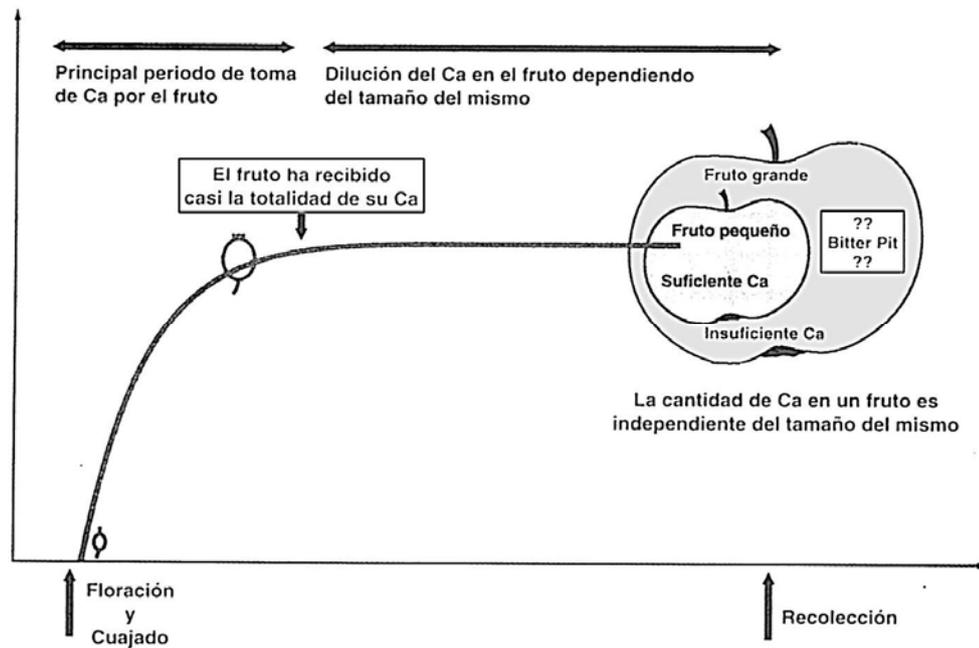


Figura 3: Representación de la absorción de calcio en manzanas (Faust y Shear, 1971)

Una de las causas de la escasa concentración de calcio en el fruto, en relación con la existente en el resto de órganos, de nuevo parece ser la baja tasa de transpiración (Link, 1976), y los dos factores que regulan este flujo en el interior de estos órganos son las condiciones externas ambientales y la fase de desarrollo de éstos órganos (Hanger, 1979). Si bien, aún en condiciones normales, la entrada de calcio a través del pedúnculo es más lenta que la del resto de nutrientes; su salida, sin embargo, puede ser rápida y abundante, cuando la transpiración es excesiva, alcanzando pérdidas de hasta 10 mg Kg^{-1} de peso fresco (Wilkinson, 1970). Ello se debe a la fuerte competencia por este elemento entre los frutos y los brotes en crecimiento (meristemos apicales y nuevas hojas).

Los frutos jóvenes en su etapa de división celular rápida tienen una absorción de calcio normal a través de la corriente de transpiración. Cuando comienza el crecimiento rápido la circulación de fotosintatos y nutrientes a través del floema aumenta rápidamente, mientras que la absorción de calcio cae a niveles muy bajos.

Las manzanas jóvenes, en desarrollo tienen una cutícula muy permeable, una alta tasa de transpiración y están fotosintetizando activamente. Durante este periodo el fruto necesita gran cantidad de agua y relativamente pocos fotosintatos, siendo suministrado el agua y el calcio principalmente a través del xilema. Cuando los frutos crecen, disminuye la transpiración, la tasa de fotosíntesis y también decae la relación superficie/volumen de fruto. A partir de este momento, el fruto recibe fotoasimilados en mayor cantidad, y la ruta principal de transporte de agua cambia del xilema, al floema, donde el calcio es prácticamente inmóvil. A medida que el fruto crece, la absorción de calcio, vía floema, al estar restringida, no sigue el mismo ritmo que la expansión del fruto por lo que la concentración de calcio decae y se diluye progresivamente (Himelrick ,1983). En este sentido, Plisek (1995) encuentra una relación lineal entre el contenido de calcio en fruto (mg Ca^{2+} / fruto) y su peso. Sin embargo, la concentración de calcio disminuye exponencialmente con el aumento de tamaño del fruto.

La distribución del calcio que penetra en el fruto resulta bastante irregular, ya que la mayor parte permanece inmovilizado como oxalato en el floema peciolar, en la zona de inserción con el fruto (Stebbins y Dewey, 1972) su concentración suele ser mínima inmediatamente debajo de la piel y en la zona calicina, que precisamente son los lugares donde suele manifestarse el bitter pit (Ferguson y Watkins, 1989).

1.1.5. Relación entre Calcio y Fitohormonas

Las fitohormonas, especialmente el ácido abscísico (ABA) y las citoquininas, pueden afectar la absorción y la translocación a los brotes (Jones y Lunt, 1967; Karmoker y Van Steveninck, 1978). El ABA disminuye y las citoquininas aumentan la resistencia de las raíces a la absorción de agua y esto influye en la absorción de Ca^{2+} .

El ácido indolacético (IAA) juega un papel importante en el transporte del Ca^{2+} en plantas (Felle, 1988). De hecho, Banuelos et al. (1987), describen un mecanismo de transporte de calcio controlado por el IAA que producen los frutos independiente del flujo de transpiración. Hertel (1983) propuso que la acción de las auxinas y su transporte podría influenciar la entrada de calcio y permitir el contratransporte de IAA y Ca^{2+} en contra de sus respectivos gradientes electroquímicos. Este mismo autor propone la localización de estos transportadores en el tonoplasto y membrana plasmática, de forma que la presencia de auxinas pudiera promover la liberación del Ca^{2+} desde las vacuolas o paredes celulares para elevar la concentración citoplásmica de Ca^{2+} que podría actuar, vía calmodulina, como un mensajero acoplado a la auxina. El crecimiento inducido por auxinas produce un incremento del Ca^{2+} citoplasmático (Ayling y Clarkson, 1996), que podría estimular el flujo vesicular desde el aparato de Golgi hasta la pared celular. Esto incrementaría la síntesis de paredes celulares y su renovación que, a su vez, aumentarían la tasa de elongación.

1.1.6. Las Auxinas

La primera auxina fue identificada como el ácido indolil-3-acético (IAA). El IAA es activo en cantidades de submicrogramos y está asociado a muchos procesos fisiológicos, incluyendo dominancia apical, tropismo, elongación de brotes, división celular en el cambium e iniciación radicular.

Durante el siglo XIX, Ciesielski estudió la respuesta geotrópica de las plantas y Charles Darwin además del efecto de la gravedad, estudió el efecto de la iluminación lateral (fototropismo) sobre el movimiento de las plantas. Estas investigaciones llevaron a Went en 1926 a obtener un factor promotor del crecimiento en coleóptilos de avena, que lo denominó **auxina**. Así, auxina es un término genérico que designa los compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la elongación de las células de los brotes.

Se han sintetizado auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido naftalen-1-acético (NAA) que se usan ampliamente en horticultura para inducir el desarrollo del fruto. A altas concentraciones las auxinas sintéticas son herbicidas muy efectivos.

1.1.6.1. Biosíntesis y Metabolismo de auxinas

El IAA es químicamente similar al aminoácido triptófano, precursor primario en su ruta biosintética. Se sugieren dos mecanismos para explicar esta conversión (*Figura 4*):

- El triptófano a través de una reacción de transaminación pasa al ácido indolpirúvico que por descarboxilación se transforma en indoacetaldehído de cuya oxidación se obtiene el IAA.
- Un segundo mecanismo sugiere una descarboxilación del triptófano para convertirse en triptamina que una vez desoxidada y desaminada produce indoacetaldehído.

Estos mecanismos están regulados por enzimas que son más activas en los tejidos más jóvenes, como meristemos de los brotes apicales, hojas y frutos en crecimiento, que a su vez son los tejidos donde se encuentra mayoritariamente el IAA (Davies, 1995).

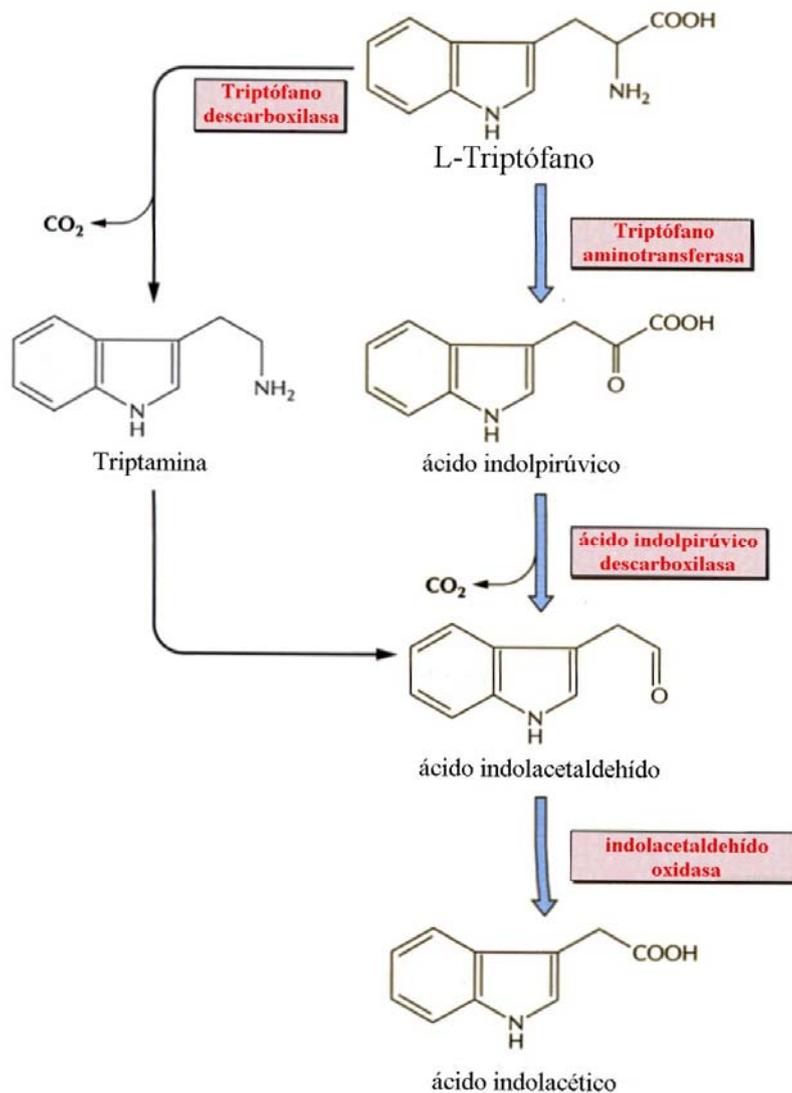


Figura 4: Posibles rutas metabólicas de la síntesis de IAA.

1.1.6.2. Distribución y transporte de auxinas

La concentración de auxinas es máxima en los ápices en crecimiento, es decir, en la punta del coleóptilo, en las yemas y en los ápices en crecimiento de hojas y las raíces. Sin embargo, las auxinas distribuidas por la planta también proceden de regiones meristemáticas (Thimann, 1934). La concentración de

auxina desciende gradualmente desde el ápice a la base del coleóptilo. En la zona radicular también se observa un aumento suave de concentración en dirección al ápice de la raíz. Sin embargo, la cantidad de auxinas es mucho mayor en el ápice del coleóptilo que en el de la raíz.

El transporte de las auxinas por las plantas se debe a un estímulo activo desde el ápice del coleóptilo hasta la base, en dirección basípeta. Jacobs (1961) comprobó que existía un movimiento acrópeto, aunque solamente era 1/3 del basípeta. Asimismo, una parte de la auxina producida por las hojas es transportada por el floema hasta otras partes de la planta (Audus, 1959).

El transporte de auxina en los tejidos vegetales tiene lugar a velocidades suficientemente altas como para excluir la difusión como vía principal. Las velocidades varían en función del tipo de planta y es mayor para el movimiento basípeta (6-26 mm/hora) que para el acrópeto (1-2 mm/hora). La velocidad de desplazamiento debe ser lo suficientemente alta como para que las auxinas puedan circular en contra del gradiente de concentración.

1.1.6.3. Funciones de las auxinas

A continuación se muestran algunas de las respuestas de las plantas ante la presencia de auxinas (Davis, 1995; Mauseth, 1991; Raven et al., 1992; Salysbury y Ross, 1992):

- Estimula el elongación celular.
- Estimula la división celular en el cambium.
- Estimula la diferenciación del xilema y floema.
- Estimula la iniciación radicular en injertos y en el desarrollo de raíces laterales en tejidos en cultivo.
- Fototropismo y gravitropsimo.
- Estimula el crecimiento de las yemas apicales e inhibe el crecimiento de las laterales.
- Retrasa la senescencia de hojas.
- Puede inhibir o promover (vía etileno) la caída de hojas y frutos.
- Puede inducir el crecimiento del fruto en algunas plantas.
- Participa en el movimiento de asimilados por el floema.

- Retrasa la maduración de la fruta.
- Promueve el crecimiento de algunas de las partes de las flores.
- Estimula la producción de etileno a altas concentraciones.
- Estimula la respiración.
- Estimula la producción de frutos partenocárpicos.

1.1.7. El Calcio en la célula

Las plantas responden a una gran variedad de señales químicas y ambientales. La forma en que las plantas perciben las señales y producen una respuesta constituye una de las áreas de investigación más importante y modernas de la biología celular de plantas (Blancaflor y Gilroy, 2000).

Fukumoto y Nagai (1983) consiguieron inducir la aparición de manchas similares al bitter-pit infiltrando con inhibidores de la calmodulina. Desgraciadamente, se abandonó esta línea de investigación antes de que se produjeran los espectaculares descubrimientos acerca del homeostato de calcio y del papel del calcio como único elemento mineral mensajero en la transducción de señales (Rudd y Franklin Tong, 1999; Harmon et al., 2000).

Tanto en plantas como en animales los niveles de calcio libre encontrados en el citosol son extremadamente bajos (Ramussen and Barret, 1984; Gilroy et al., 1990). La concentración de calcio citoplasmático libre en las plantas está normalmente comprendida en un rango de 0,1 a 1 μM , a diferencia de otros iones cuyas concentraciones están en el rango milimolar. Debido a la diferencia existente entre la concentración de calcio en el citosol y en la pared celular (entre 1000 y 10000 veces), además de una diferencia en el potencial de membrana (citoplasma de -120 a -170 mV), se produce un enorme gradiente electroquímico para el flujo de calcio. Gilroy (1990) y Knight et al.,(1991) muestran que las señales físicas y químicas pueden alterar el estado de la concentración intracelular de calcio en las plantas y este cambio de concentración dispara una cascada de procesos bioquímicos que finalmente conducen a la respuesta en la planta (Jena et

al. 1989; Braam, 1992). Por tanto puede decirse que la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) está bajo control bioquímico y fisiológico (Figura 5).

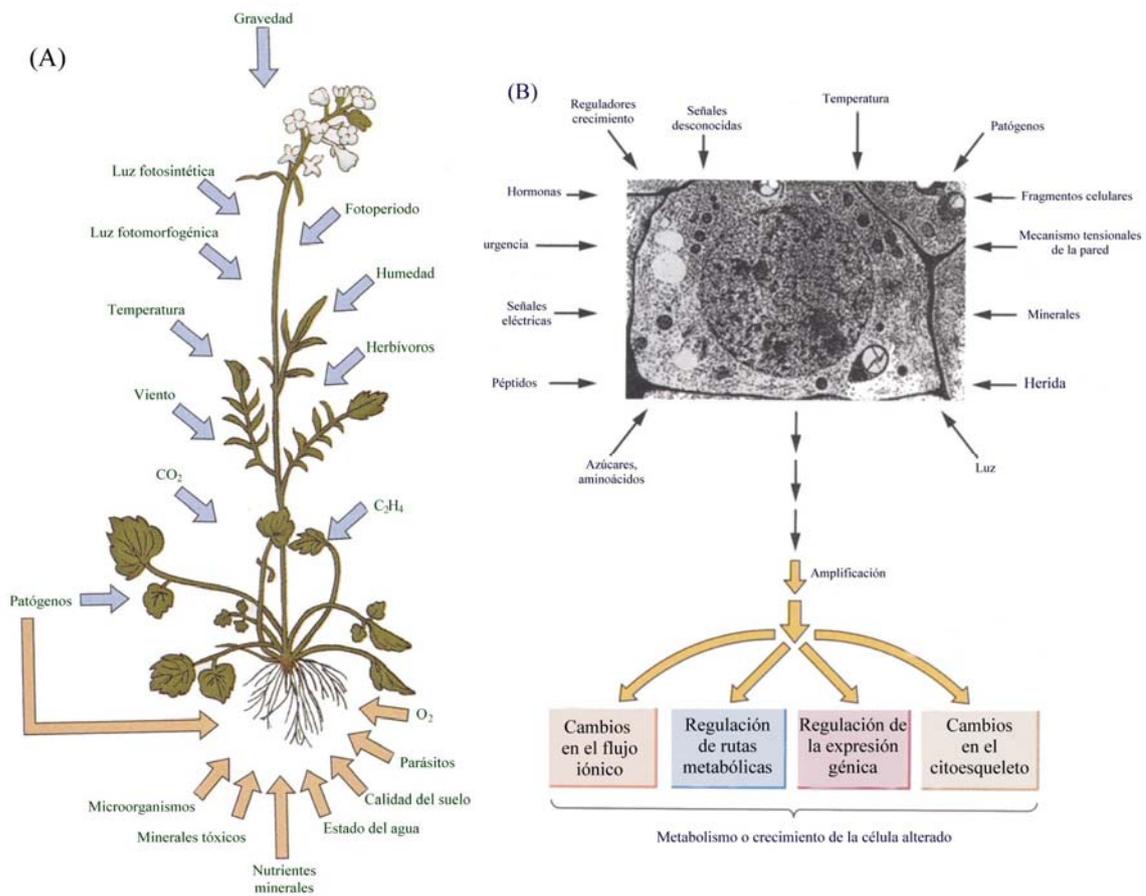


Figura 5: Señales que afectan al desarrollo de las planta. (A) externas; (B) internas

1.1.7.1. Transducción de señales

Para que el calcio pueda ser considerado como mensajero capaz de regular los procesos fisiológicos evocados por estímulos primarios deberían cumplirse cuatro criterios (Hepler y Wayne, 1985; Gilroy et al., 1987; Povaiah et al., 1987):

- I. El Ca^{2+} citosólico debe cambiar en respuesta a estímulos primarios y tales cambios precederán a la respuesta fisiológica
- II. La inducción artificial de cambios en el Ca^{2+} citosólico evocará

una respuesta fisiológica en ausencia de estímulos primarios.

III Las células deben poseer el mecanismo para percibir los cambios en Ca^{2+} citosólico y transformarlo en una respuesta fisiológica

IV El bloqueo de los cambios en el Ca^{2+} citosólico o el sistema de percepción de Ca^{2+} debe prevenir la respuesta fisiológica a estímulos externos.

En efecto, se han encontrado un buen número de evidencias experimentales que apoyan estos criterios. Por lo tanto, el concepto de un sistema de Ca^{2+} mensajero universal en la transducción de estímulos externos en plantas está ampliamente aceptado (Roux y Slocum, 1982; Roberts et al., 1986; Poovaiah y Reddy, 1987; Poovaiah et al., 1987, 1988; Rudd y Franklin-Tong, 1999).

La regulación del Ca^{2+} es una función esencial de la célula y se realiza gracias a un conjunto de procesos llamados colectivamente el homeostato de Ca^{2+} . Bush (1995) discutió algunos de los progresos que se realizaron para identificar los componentes del homeostato de Ca^{2+} en plantas - bombas, transportadores secundarios y canales iónicos - así como para caracterizar la manera en que opera el homeostato en células vivas durante la transducción de señales. Actualmente se baraja una hipótesis para comprender cómo el homeostato de Ca^{2+} influye en la función celular. Los estímulos externos son capaces de inducir cambios en la concentración de calcio modificando las propiedades espaciales y temporales de la célula. Así, la regulación localizada de los cambios de Ca^{2+} en la célula, junto con las modificaciones de actividad de otros intermediarios celulares, puede explicar la variedad y especificidad de las respuestas celulares provocadas por cambios sutiles en la concentración de Ca^{2+} . Las funciones reguladoras del homeostato de calcio abarcan desde el control del transporte del ión hasta su expresión génica. El progreso en su conocimiento y su significado en células vegetales se ha acelerado gracias a las medidas directas de actividad de los canales iónicos y los niveles de

Ca^{2+} en células vivas, y por la caracterización molecular de los transportadores de Ca^{2+} . La convergencia de estas tres informaciones ha mostrado que la maquinaria celular para establecer la homeostasis de Ca^{2+} en plantas, aunque usada para diversos fines, es marcadamente similar a la encontrada en otras células eucariotas (Blatt y Thiel, 1990; Muto, 1992; Roberts y Harmon, 1992; Coté y Crain, 1993; Gilroy et al., 1993; Poovaiah y Reddy, 1993).

La regulación de Ca^{2+} depende del gradiente electroquímico transmembrana de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y la membrana intracelular. La células mantienen una concentración muy baja de Ca^{2+} citosólico (100-200 nM) para facilitar los procesos de regulación. La vacuola y el retículo endoplasmático (RE) son almacenes intracelulares de Ca^{2+} (alrededor de 1 mM) el cual puede ser movilizado por la generación de inositol (1,4,5)-trifosfato (IP_3) y adenosindifosfato cíclico (cADPR), como sugieren Rudd y Franklin-Tong (1999). En la pared celular, donde el Ca^{2+} actúa como molécula estructural, la concentración de Ca^{2+} se estima entre 0,5 y 1 mM.

Las mitocondrias, cloroplastos e incluso el núcleo pueden actuar como almacenes de Ca^{2+} (*Figura 6*). Estos orgánulos pueden contener además otros compuestos de Ca^{2+} transductores de señales como la calmodulina (CaM). La membrana nuclear contiene también elementos esenciales de un sistema generador de IP_3 .

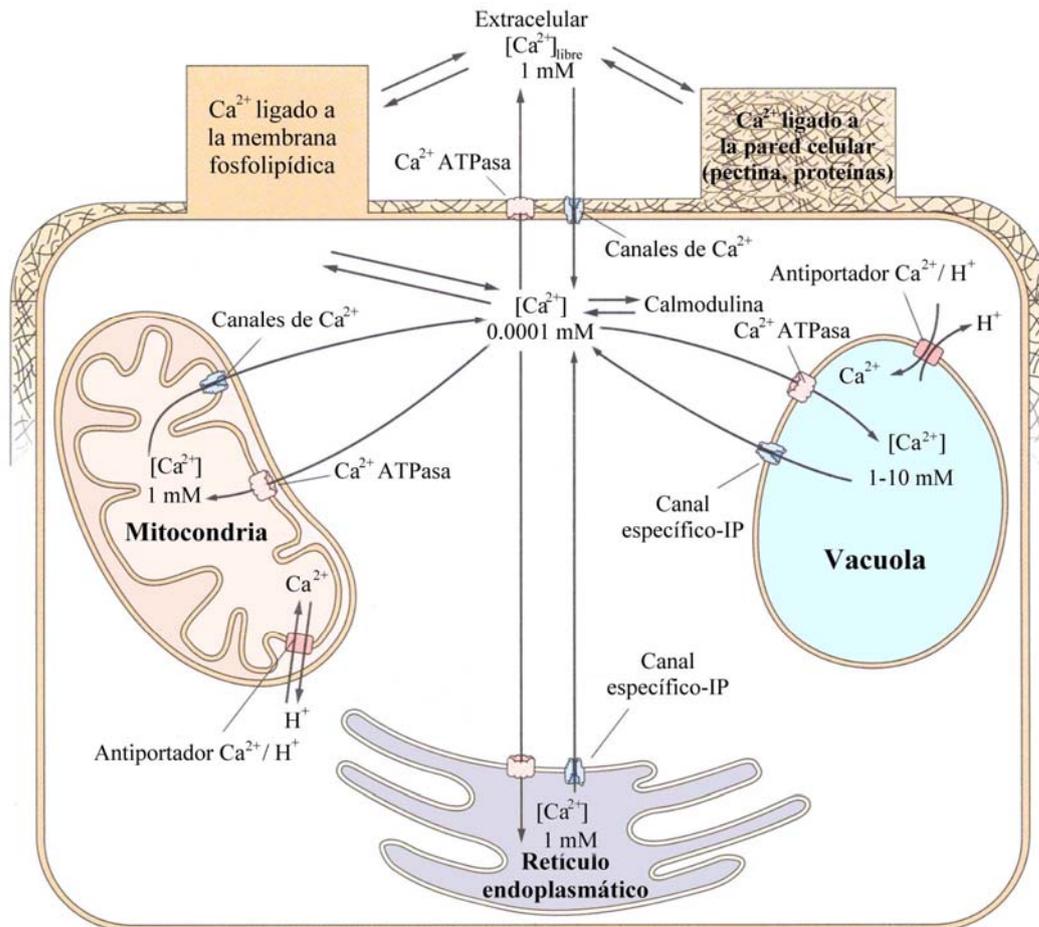


Figura 6: Interacciones de Ca^{2+} intra y extracelular en la regulación celular

Cuando las células reciben señales, los canales de Ca^{2+} se abren temporalmente y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta rápidamente. Numerosas proteínas unidas a Ca^{2+} se activan en ese momento, incluida la calmodulina y las quinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) (Harmon et al., 2000). Una vez formado, el complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ traduce la señal uniéndose a una proteína diana.

Las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son interrumpidas por la actividad de las ATPasas localizadas en la membrana plasmática, en el tonoplasto, y en la membrana del retículo endoplasmático (RE). Estos bombos reestablecen y mantienen baja la concentración de Ca^{2+} citoplasmático. En el momento en que las H^{+} -ATPasa de la

membrana plasmática y el tonoplasto eliminan protones del citosol, las Ca^{2+} -ATPasas usan la energía libre liberada en la hidrólisis del ATP para translocar el Ca^{2+} dentro de los compartimentos extracitosólicos en contra del gradiente electroquímico. Algunas de las Ca^{2+} -ATPasas son dependientes del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$.

La existencia de los canales de calcio permite que las células vegetales realicen un gran número de procesos inducidos por transducciones de señales, incluyendo la formación de yemas, el crecimiento polar, la regulación del intercambio gaseoso, la secreción, los movimientos, y el crecimiento y desarrollo regulado por luz y hormonas (Hepler y Wayne, 1985; Leonard y Hepler, 1990). La activación de los canales de Ca^{2+} permite la existencia de flujos transmembrana de Ca^{2+} . Estos flujos dan como resultado que, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pueda temporalmente alcanzar concentraciones muy altas (hasta 300-400 mM), particularmente cerca de la entrada de los canales abiertos (*Figura 7*).

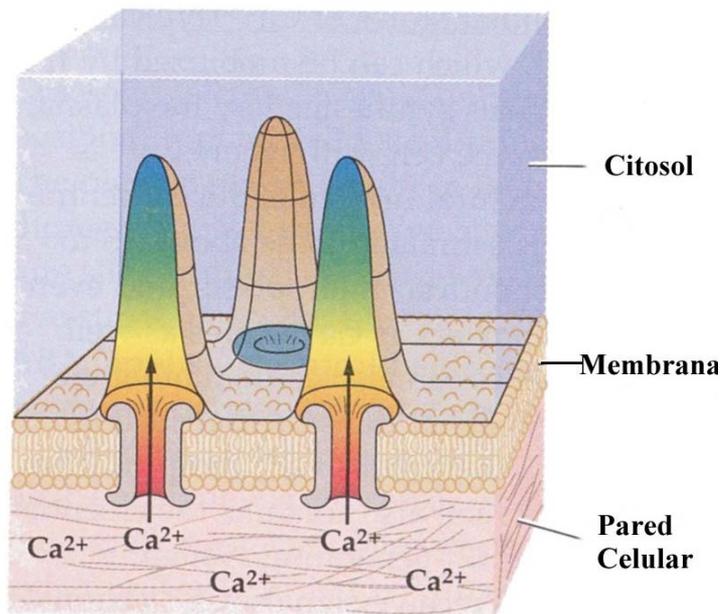


Figura 7: Distribución de Ca^{2+} en el citoplasma en la proximidades de los canales abiertos de Ca^{2+} .

Esta alta concentración dispara numerosos procesos biológicos celulares por modulación de las quinasas, canales iónicos, y otras proteínas de control celular (Leonard y Hepler, 1990). Por otra parte, las células no pueden soportar, por mucho tiempo, concentraciones altas de Ca^{2+} que podrían interferir en el metabolismo celular por competición con Mg^{2+} por el ATP.

Hasta el momento se han detectado en plantas dos clases generales de canales de Ca^{2+} como se observa en la *Figura 8*. Estos canales de Ca^{2+} han sido encontrados en la membrana plasmática, en el RE rugoso, y en el tonoplasto. El primer tipo correspondería a los canales de Ca^{2+} de membrana plasmática, que permiten el flujo de Ca^{2+} desde el espacio de la pared celular en el citosol. En este grupo se incluyen canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC), canales permeables a Ca^{2+} activados por ácido abscísico (ABA) y canales activados por dilatación de membrana. El segundo tipo lo constituyen los canales de Ca^{2+} localizados en la membrana de orgánulos intracelulares, que permiten la liberación del Ca^{2+} almacenado y que incluyen los canales activados por IP_3 y por Ca^{2+} (Alexandre et al., 1990; Schroeder y Hagiwara, 1990)

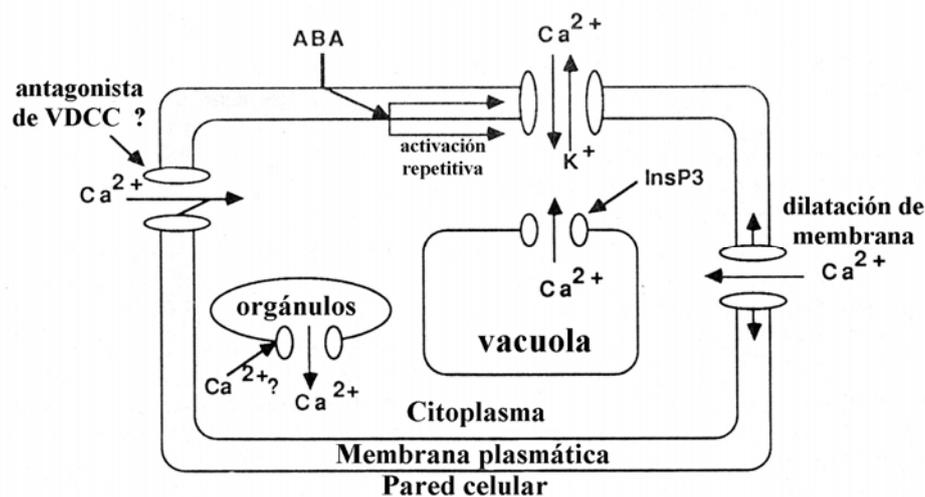


Figura 8: Diagrama esquemático de los diferentes canales de Ca^{2+} en plantas superiores (Schroeder y Thuleau, 1991).

A continuación se representa una célula utilizando una escala pseudocolor que indica la concentración de calcio en el citoplasma y en los orgánulos de esta célula. Las flechas punteadas de la *Figura 9* que unen el receptor de la membrana plasmática a IP₃R indican que la(s) ruta(s) no están bien caracterizadas en plantas. Estos incrementos de concentración intracelular de Ca²⁺ producen respuestas celulares específicas frente a las señales extracelulares.

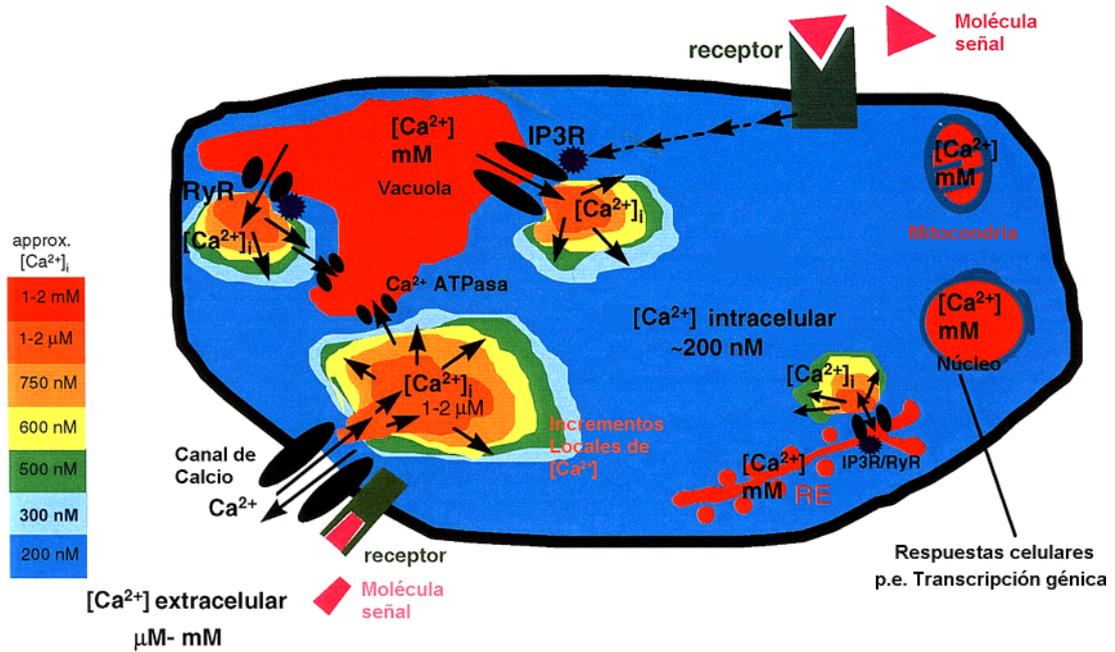


Figura 9: Localización y movilización de calcio durante la transducción en la célula (reproducción con permiso de los autores; Rudd y Franklin-Tong, 1999)

1.1.7.2. Proteínas implicadas en la transducción de señales

Las principales dianas de las señales de calcio en células eucariotas pertenecen a una familia de proteínas que se unen al calcio conocidas como proteínas moduladas por calcio. Como recopilaron Moncrief et al (1990), se han caracterizado unas 150 proteínas diferentes de esta clase. Esta diversidad de receptores de calcio refleja la forma especializada estructural y funcionalmente

necesaria para que se produzcan las respuestas celulares.

La estructura de estas proteínas presenta dos hélices en cada lado del bucle, formando un dominio hélice-bucle-hélice especializado que se une al Ca^{2+} llamado “*hand-EF*” (Moncrief et al., 1990; Strynadka et al., 1989).

Las proteínas moduladas por calcio mejor caracterizadas en plantas son la calmodulina (CaM) y las quinasas dependiente de calcio (CDPK). La calmodulina (CaM) es el miembro de esta familia de proteínas más ampliamente distribuido y se piensa que es un receptor intracelular primario de Ca^{2+} en todas las eucariotas.

1.1.7.2.1 Calmodulina

A finales de los años 70, se descubrió la existencia, en plantas, de la calmodulina (CaM), proteína ligada a Ca^{2+} , y también de enzimas dependientes de CaM, proponiéndose que el Ca^{2+} podía actuar como un mensajero en la transducción de señales en plantas. La comprensión de que el Ca^{2+} puede jugar un papel de mensajero dio como resultado un incremento de la investigación sobre la actividad del Ca^{2+} (Hepler y Wayne, 1985; Trewavas, 1986; Poovaiah y Reddy, 1987).

La Calmodulina (CaM) es una proteína que liga Ca^{2+} , de bajo peso molecular (de 15 a 17 kDa), altamente conservada, y que actúa como el principal receptor de calcio tanto en células vegetales como animales. Cada molécula de calmodulina (*Figura 10*) posee cuatro sitios de unión de Ca^{2+} o *loops*, que contienen 12 aminoácidos y son ricos en glutamato y aspartato, y cuyas constantes de disociación se encuentran en el rango de 10^{-6}M . Actúa en la transducción de señales como mensajero secundario en una amplia forma de respuestas celulares. Las calmodulinas vegetales comparten muchas características estructurales y funcionales con sus homólogas en animales y levaduras, pero la expresión de múltiples isoformas de esta proteína parece ser un distintivo de las plantas superiores. El espectro de proteínas vegetales que se une a calmodulina comparte

algunas características con las encontradas en animales, pero en plantas el número de proteínas reguladas por calmodulina parece ser extraordinariamente alto (Zielinski, 1998).

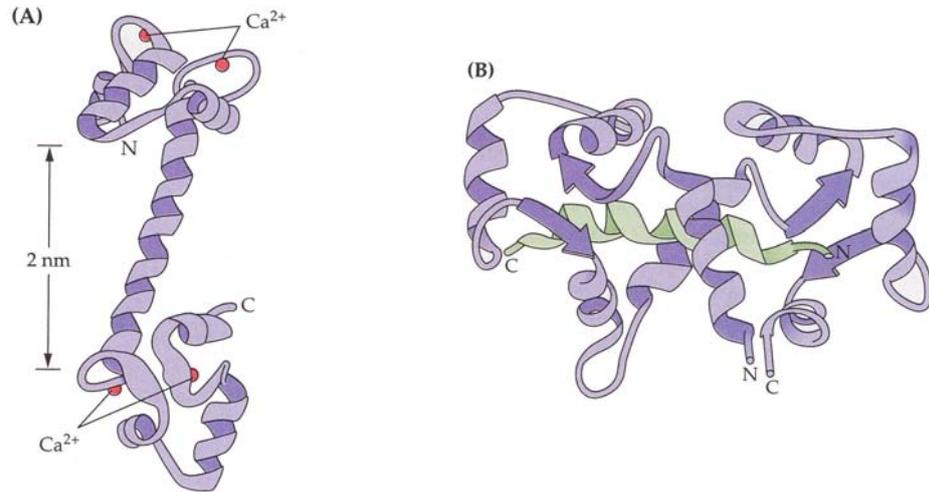
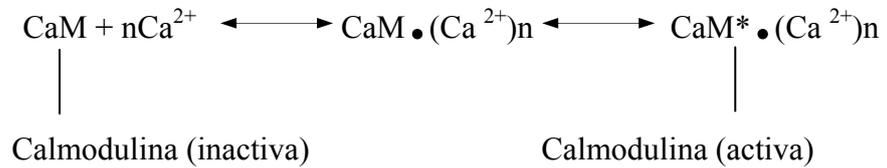


Figura 10: Estructura de la Calmodulina. (A) sin acomplejar (B) complejo Ca^{2+} /calmodulina..

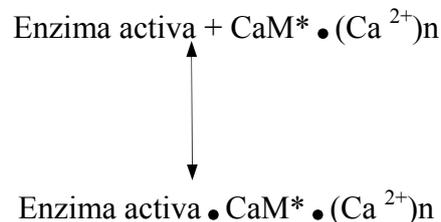
La calmodulina actúa por unión con pequeñas secuencias peptídicas dentro de proteínas diana, induciendo cambios estructurales que alteran sus actividades en respuesta a la concentración intracelular de Ca^{2+} . Este proceso de interacción entre la CaM y sus enzimas dianas tiene lugar en dos etapas:

1. Los iones Ca^{2+} se unen a la CaM, dando lugar a un cambio conformacional hacia un estado activo (indicado por un asterisco)



2. Cuando la CaM en su conformación activa se une a la enzima diana,

esta última sufre un cambio conformacional hacia una forma más activa.



Han pasado más dos décadas desde la descripción de la activación de la NAD quinasa en guisante (Muto y Miyachi, 1977), lo que condujo al descubrimiento de CaM en plantas (Anderson et al., 1980). En los siguientes 20 años, se ha demostrado el papel del Ca^{2+} como un mensajero secundario en plantas, y se ha aceptado que la CaM es un receptor intracelular primario para Ca^{2+} y regulador multifuncional de la actividad de diversas proteínas.

1.1.7.2.2 *Proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPK)*

La superfamilia de quinasas dependientes de calcio, esta integrada por cuatro tipos de proteínas que se clasifican dependiendo de su regulación: i) uniéndose a Ca^{2+} ; ii) estableciendo enlaces con complejos Ca^{2+} /calmodulina quinasas dependientes de calmodulina; iii) como combinación de los dos tipos anteriores, es decir con calcio y con quinasas dependientes de calmodulina; y iv) sin combinarse con ninguna de las anteriores (Harmon et al., 2000). La primera CDPK fue caracterizada y purificada en soja (Harmon et al., 1987; Putnams-Evans, 1987). La proteína nativa tiene un peso molecular de 52,2 kDa, y contiene dos polipéptidos inmunológicamente relacionados de 52 y 55 kDa. Las CDPK se activan por concentraciones micromolares de Ca^{2+} . Harper et al. (1991) obtuvieron la secuencia de aminoácidos de la CDPK de soja, encontrando un

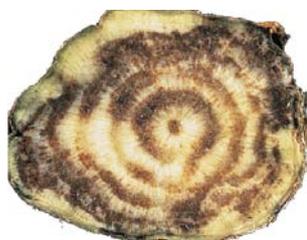
dominio catalítico de proteínas quinasas y una región semejante a la CaM con cuatro dominios de unión al Ca^{2+} por el extremo carboxilo terminal. La presencia de estos dominios de unión para Ca^{2+} explica la activación directa de Ca^{2+} por las CDPKs (Poovaiah and Reddy, 1993).

1.2. Alteraciones de las plantas inducidas por la deficiencia de calcio.

La nutrición cálcica de las plantas, no sólo suscita el interés de biólogos moleculares, bioquímicos y fisiólogos, sino también, por su repercusión económica, el de agrónomos y productores hortofrutícolas.



Hoja de lechuga



Remolacha



Tomate



Pimiento



Hoja de rosal



Hoja de patata

Figura 11: Deficiencias de Calcio en distintos cultivos

Un número de fisiopatías encontradas especialmente en vegetales y frutos

son debidas a deficiencias localizadas de calcio en las plantas (*Figura 11*). Así, frutos o verduras pueden mostrar signos de deficiencia mientras el follaje adyacente está sano.

En algunos casos, los síntomas sólo aparecen o empeoran, durante un periodo de almacenamiento después de la cosecha, como es el caso del *bitter pit* (Simon, 1978). Shear (1975) registró unas 30 enfermedades relacionadas con calcio y mostró que factores tales como humedad, luz, nutrición, crecimiento, uso de reguladores de crecimiento y otros utilizados para modificar la severidad de los síntomas influyen en la concentración de calcio en los tejidos.

Con frecuencia, se encuentra que frutos con síntomas de enfermedades relacionadas con calcio tienen un contenido en calcio más bajo que en las hojas de las plantas que los contienen (Marschner, 1974). Esta diferencia de contenido en calcio puede estar relacionada con los mecanismos implicados en el movimiento dentro de la planta. Las hojas absorben el calcio suministrado por las raíces a través del xilema, y una vez allí tienden a permanecer, acumulándose a medida que las hojas envejecen. Por otra parte, frutos como la manzana sólo reciben un aporte inicial de calcio vía xilema para, después de las primeras semanas de desarrollo, disminuir concomitantemente con la velocidad de transpiración. Más tarde el consumo de nutrientes entra vía floema donde el calcio es prácticamente inmóvil. Desde aquí una vez que el transporte del xilema se interrumpe, el fruto, a pesar de seguir aumentando de volumen, recibe muy poco calcio, y por tanto, su concentración se diluye progresivamente (Simon, 1978).

1.2.1. Inhibición del crecimiento

Las plantas rara vez muestran signos de deficiencia de calcio en suelos cultivables, pues es uno de los cationes más abundantes en la solución del suelo. Sin embargo, bajo condiciones experimentales artificiales, las plantas cultivadas

en un medio deficiente de calcio desarrollan síntomas en las raíces, tallos, hojas y frutos (Sanz, et al., 2000).

La deficiencia de calcio afecta a las regiones meristemáticas del tallo, las hojas y la raíz que, con facilidad, mueren tempranamente; se detiene las mitosis, por lo que las hojas jóvenes presentan malformaciones, quedando con los extremos curvados hacia atrás, las raíces son cortas y pardas, etc. Más tarde, las hojas muestran clorosis marginales y estas áreas laterales inician un fenómeno de necrosis. Al final, las hojas caen y se detiene el crecimiento del ápice. Se produce entonces la brotación de yemas laterales, a las que les ocurre lo mismo. El síntoma más característico de la deficiencia de calcio consiste en la morfología de gancho que adquieren los limbos foliares.

Sanz et al. (2000), trabajando con plantas de tomate desarrolladas en un medio hidropónico deficiente en calcio, tras el ajuste a ecuaciones logísticas de crecimiento, pudieron concluir que al final del ciclo de cultivo, la altura y el grosor del tallo de las plantas deficientes eran, dependiendo de la severidad del tratamiento, 30-50% inferiores a los de los controles. Los primeros síntomas visuales de deficiencia se observaron en las hojas más jóvenes, las raíces se oscurecieron y disminuyeron de tamaño, se interrumpió la aparición de nuevas hojas y aumentó el espesor y peso específico de las ya desarrolladas. Estos autores comparan los efectos de la deficiencia de calcio con los producidos por reguladores de crecimiento como el paclobutrazol (PBZ), cuya aplicación provoca disminución del área foliar, aumento del espesor de hoja y la inhibición.

1.2.2. Alteraciones fisiológicas

Los últimos avances encaminados a caracterizar la deficiencia de calcio en plantas utilizando parámetros fisiológicos, también se han llevado a cabo utilizando plantas de tomate en hidropónico (Sanz et al., 2001). Del brillante

trabajo de estos autores se deduce que la deficiencia de calcio no incide directamente en la potencialidad máxima de su PS II. Sin embargo, la carencia de pigmentos del ciclo de las xantofilas en las hojas jóvenes deficientes indicaría la incapacidad de disipar la energía luminosa por parte de estas hojas en formación. Por otra parte, Sanz et al., (2001), también encuentran que la expresión de la deficiencia de calcio no es sólo una función dependiente de la concentración de calcio foliar, sino que la planta posee mecanismos de adaptación a este tipo de estrés que inducen una capacidad de síntesis de pigmentos mayor que la encontrada en plantas control. La deficiencia de calcio no induce alteraciones significativas en la estequiometría pigmentaria de estructuras de antena y centros de reacción del aparato fotosintético. Y, finalmente, el ligero descenso en la eficiencia del PS II (F_v/F_m) de las plantas de tomate deficientes en calcio, se agudiza conforme disminuye la concentración de calcio en el medio de cultivo.

Estos datos sugieren que al restringirse el crecimiento de las plantas, ya no es necesaria la producción de los fotoasimilados que se dirigen, en condiciones normales, a los sumideros de actividad fotosintética, es decir, a los órganos en crecimiento. Como hipótesis, los autores apuntan que, ante la carencia de calcio, la planta interrumpe los procesos asociados al crecimiento tratando de mantener vivas el resto de las estructuras existentes, y que debido a la escasa movilidad de este elemento no desarrollan síntomas de deficiencia.

1.2.3. Fisiopatías de los frutos relacionadas con el Calcio

Los desordenes fisiológicos del fruto fresco, en contraste con las enfermedades producidas por patógenos, pueden ser originados por cualquier factor adverso del medio, ya sea antes o después de la recolección, y pueden estar asociados con unos cultivares y no con otros, debido a su predisposición genética. Algunas fisiopatías, como el escaldado y el arrugamiento de las manzanas, son características de los frutos inmaduros, mientras que otras como la

descomposición interna o el corazón acuoso se producen en frutos excesivamente maduros. Ciertas alteraciones afectan sólo a determinados tejidos, mientras que otras afectan al fruto completo. Algunos son visibles en cosecha, mientras que otros se aprecian solamente después de un tiempo de almacenamiento, como es el caso del *bitter pit* o mancha amarga.

1.3. Bitter Pit

El bitter pit no está provocado por un patógeno sino que es una fisiopatía que ocasiona grandes pérdidas en la producción de manzanas, por la depreciación comercial que origina el desarrollo de este desorden, generalmente, durante el almacenamiento. Es un problema que preocupa a fruticultores y cooperativas desde hace más de 100 años, y, a pesar de los numerosos estudios científicos realizados desde entonces, no se conocen, con certeza, las causas que desencadenan su aparición.

Como reflejo de la importancia de este desorden podemos decir que en las últimas campañas de almacenamiento y conservación se presentaron, como ya ha ocurrido en otras anteriores, unos niveles de pérdidas realmente alarmantes. Sólo en Aragón, con un 14% de la superficie nacional, se estima que 35000 toneladas de manzanas han pasado por cámara y la incidencia de bitter pit ha alcanzado, en algunos caso, cifras cercanas al 50% del fruto almacenado, con afecciones que implican una fuerte depreciación o incluso la pérdida total de la mercancía y, por supuesto, el costo de las horas de frío invertidas.

El bitter pit o mancha amarga es una desorganización celular que se manifiesta como pequeñas áreas inicialmente incoloras y acorchadas, que van adquiriendo un color parduzco característico. Localizadas, generalmente en zonas aisladas del exterior del mesocarpio a 1-2 mm debajo de la piel y con un tamaño aproximado de 2 a 6 mm. La mayor concentración de manchas se localiza en la

zona calicina del fruto (Monge et al., 1995).



Figura 12: Manzana con bitter pit

Según Wilkinson (1972), estas manchas están constituidas por células muertas y deshidratadas que conservan intactas sus paredes. Además de estas manchas, las manzanas pueden presentar una piel grasa, un deterioro en la pulpa y un descenso en la concentración de ácidos y azúcares.

Estudios histológicos realizados por Smock y Van Doren (1937) mostraron que el primer signo de esta fisiopatía es el colapso de la pared celular y que cuando las manchas ya son visibles por el ojo humano, la plasmolisis del citoplasma ya ha ocurrido.

Los síntomas podrían comenzar 4-6 semanas antes de la caída de los pétalos cuando los tejidos afectados tienen una alta respiración y producción de etileno. Este es el periodo de mayor síntesis de proteínas y pectinas con un gran movimiento de iones orgánicos hacia las áreas afectadas. Éstas, a su vez, retienen granos de almidón, perjudiciales para los tejidos vegetales. Así, según Ferguson (1990), la escasez de calcio en las membranas incrementa su permeabilidad a

ácidos y fenoles, los cuales pueden penetrar más fácilmente en el citoplasma y destruir o coagular enzimas de mitocondrias o de otras partículas subcelulares.

Resultados como los descritos en el párrafo anterior, indujeron a Blasco (1977) a proponer que las células afectadas por bitter pit conservan intactas sus paredes, entre las que aún quedan retenidos granos de almidón y mitocondrias en perfecto estado, sin que manifiesten falta de adhesión o acorchamiento. Esto podría significar que, por algún motivo, no se mantiene la semipermeabilidad de la membrana celular. Sus fibras se disgregan y acumulan corpúsculos de grasa, lo que ocasiona una pérdida de turgencia.

Cuando el fruto está aún en el árbol, el daño puede pasar desapercibido, especialmente si el régimen hídrico es adecuado, pero los síntomas se manifiestan claramente al exterior con posterioridad, y de forma más acusada tras un período de 6 a 12 semanas de conservación en cámara a 3 ó 4°C, a veces como manchas negruzcas del tamaño de lenticelas en las zonas más coloreadas de la epidermis, las cuales afean el aspecto del fruto y le dan un sabor amargo característico (Blasco, 1977).

El portainjerto ejerce una influencia selectiva sobre la traslocación de ciertos elementos, en particular del calcio, así que es necesario, no sólo una variedad poco susceptible, sino el patrón adecuado.

No todas las variedades de manzano presentan la misma susceptibilidad al bitter pit. Esta susceptibilidad está influenciada por el patrón y por determinados factores ambientales. Bergmann (1992) hace una clasificación de variedades de manzano en cuatro grupos en función del potencial que presentan para desarrollar esta enfermedad:

Altamente susceptibles: Albrechts, Auralia, Blenheim Renette, Carola, Clivia, Cox's Orange Pippin, Gold Parmaine, Habert Renette, Herma, Ingrid Marie, James Grieve y Maigold.

Moderadamente susceptibles: Alkemene, Apollo, Breuhahn, Roba, Rogo, Red Boxkoop y Starcrimson.

Ligeramente susceptible: Bancroft, Belgolden, Champagne, Renette, Gloster, Helios, Jonagold, Johnathan, Juno, Landsberger, Laxton Superb, Macaun, Notario, Redspur Delicious, Swiss Orange, Satrking Delicious y Yeollowspur Delicious.

Muy poco susceptibles: Berlepsch, Golden Delicious, Idared, Red McIntosh y Spartan.

1.3.1. Posibles Causas del bitter pit

El bitter pit es un fenómeno complejo; y su desarrollo depende de numerosos factores pre y post cosecha (Faust and Shear, 1968; Bünemann, 1972; Delver, 1978; Perring, 1986; Ferguson and Watkins, 1989). Estos factores incluyen condiciones climáticas y del suelo, aspectos nutricionales y culturales, relación interna entre crecimiento vegetativo y generativo, y condiciones de almacenamiento. En la actualidad existen cuatro teorías que intentan explicar el origen de esta enfermedad.

Una primera teoría, la más antigua y extendida recogida en una reciente revisión de Tomala (1997a), atribuye la aparición del bitter pit a una deficiencia de calcio o un exceso de potasio en el fruto. Numerosos autores apuntan a la existencia de una estrecha relación entre alteraciones del fruto y la relación K/Ca, y sugieren la posibilidad de predecirlas basándose en valores de dicha relación. En este sentido Tomala et al., (1997a) sugieren que la relación K/Ca es mejor indicador, para pronosticar la posible ocurrencia de bitter pit, que el contenido de K o Ca por separado y recomiendan no almacenar frutos con una relación K/Ca mayor de 36; relación que puede aumentar en unas fechas situadas entre los 80-100 días tras plena floración (Val et al., 1999); momento que coincide con el de

máximo crecimiento del volumen del fruto (Aznar et al., 1999). En este sentido, (Curtis et al., 1990) ya habían propuesto que se producía un movimiento de las formas hidrosolubles de Ca desde el fruto hacia las hojas adyacentes, provocando el desarrollo de desórdenes fisiológicos. La baja concentración de calcio en el fruto da lugar a la aceleración de ciertas alteraciones entre las que se encuentra el bitter pit.

La segunda teoría propuesta por Saure (1996) propone que el factor causante de esta fisiopatía es el aumento de giberelinas (GA's) en el fruto. Esto provocaría un incremento de la permeabilidad celular en áreas del fruto cercanas a los haces vasculares, que les haría más sensibles al estrés hídrico en postcosecha y, por lo tanto, al bitter pit. En este caso, la deficiencia de calcio sería un factor secundario, ya que la presencia de este elemento podría estabilizar las membranas reduciendo así su permeabilidad, pero la alta concentración de giberelinas impediría su movimiento hacia el fruto. Esta teoría se fundamenta en que aplicando reguladores de crecimiento que inhiben la formación de giberelinas, se reduce la incidencia del bitter pit independientemente de la concentración de calcio en el fruto.

La tercera teoría propone que durante la fotosíntesis, proceso que consiste básicamente en la fijación de CO₂ y de nutrientes inorgánicos absorbidos por las raíces, se forman en las hojas compuestos esenciales, que pueden absorber también sustancias tóxicas como oxálico y cítrico (Steenkamp et al., 1983), y que, a diferencia de otros organismos vivos, las plantas carecen de mecanismos para eliminarlos. Como respuesta, las plantas intentarían metabolizar estos compuestos mediante cristalizaciones o formación de sustancias complejas con el calcio (Steenkamp et al., 1983). Si la cantidad de calcio no es suficiente para neutralizar estos ácidos se produce la muerte de las células en determinadas partes de la manzana, lo cual, daría lugar a pequeñas manchas oscuras conocidas como bitter pit.

La cuarta teoría (Hertel, 1983; Banuelos, 1987) estaría relacionada con la cantidad de auxinas en el fruto, de manera que si no es suficiente la cantidad de este regulador de crecimiento en fruto, una de las vías de transporte de calcio hacia el fruto estaría impedida, y por lo tanto, no llegará suficiente cantidad de calcio, lo que conllevaría el desencadenamiento del bitter pit.

Los postulados de estas cuatro teorías no son contradictorios, y posiblemente, las causas de la aparición del bitter pit sean tan complejas que abarquen aspectos de cada una de las hipótesis mencionadas.

1.3.2. Factores implicados en el desarrollo del bitter pit

Son muchos los factores que están implicados en la incidencia del bitter pit, principalmente el contenido mineral del fruto y las prácticas culturales, y post-cosecha empleadas que a su vez influyen en el desarrollo del fruto y en su madurez.

1.3.2.1. Contenido mineral del fruto

Como ya se ha dicho anteriormente, el calcio juega un papel importante manteniendo la permeabilidad de la membrana y la rigidez de la pared celular. Además, el calcio ralentiza la emisión de etileno, disminuye la respiración y, por tanto, la maduración del fruto. La aparición o no de problemas de conservación depende de las cantidades de potasio en relación con las de Ca^{2+} en fruto. Según Missotten (1996), es importante controlar la concentración de potasio en fruto, ya que si el nivel de calcio es insuficiente, otros iones como magnesio y potasio pueden desplazarlo de sus lugares de fijación, y, en consecuencia el valor de la relación K/Ca aumentará indicando un mayor riesgo de enfermedades fisiológicas que puedan aparecer durante el periodo de almacenamiento y conservación.

Delong (1936) relacionó la susceptibilidad de las manzanas al bitter pit con una deficiencia de Ca^{2+} en fruto. Los trabajos presentados por Garman y Mathis

(1956) mostraron la relación existente entre la concentración de calcio en el fruto en cosecha y la incidencia de bitter pit después del almacenamiento; además, propuso el tratamiento foliar con sales de calcio durante el desarrollo del fruto para reducir la incidencia de la fisiopatía.

Como el Ca^{2+} en el suelo está en equilibrio generalmente con el NO_3^- , las concentraciones de ambos iones en distintos órganos del frutal (hojas y frutos) se hallan altamente correlacionadas. Cuando el nitrógeno es aplicado como nitrato, mediante aspersión foliar, se incrementa la acumulación de calcio en hojas viejas, mientras que si se aplica en forma amoniacal aumenta en las jóvenes (Vang-Petersen et al., 1973).

Lüdders (1979) demostró que un aporte de sales de amonio a árboles cultivados en arena, incrementaba la incidencia del bitter pit durante el almacenamiento del fruto, aunque no se observaban manchas antes de la recolección. Fukumoto y Nagai (1983), con manzanos desarrollados en solución nutritiva que contenía sales amónicas en lugar de nitrato, encontraron una mayor susceptibilidad de los frutos a desarrollar la enfermedad, mostrando además una menor concentración de calcio y mayor contenido de nitrógeno.

El antagonismo de otros iones con el calcio puede ponerse de manifiesto tanto en los mecanismos de absorción, traslocación y almacenamiento, como posteriormente, dentro ya del mismo fruto.

Respecto a la relación de otros elementos con el bitter pit, Sadowski y Czescil (1977), al igual que Ben (1995), encontraron, en tejidos afectados, un menor contenido de calcio y una mayor concentración de magnesio, fósforo y potasio. Este último como antagonista del calcio, retarda su absorción, y la concentración de calcio, tanto en frutos como en hojas, está correlacionada negativamente con el aporte de potasio (Forsyth y Webster, 1971). También la aplicación de magnesio, bien al suelo o por vía foliar, disminuye la concentración

de calcio en hojas y raíces (Vang-Petersen, 1974). Infiltraciones al vacío realizadas en frutos de manzano, utilizando soluciones de $MgCl_2$, demostraron que el ión Mg^{2+} induce la aparición de los síntomas de bitter pit (Kim, 1997), mientras que infiltraciones con sales de Ca^{2+} previenen su desarrollo (Burmesiter y Dilley, 1993; Retamales et al., 2000). Es de destacar que estos antagonismos se suelen producir fundamentalmente en los frutos, donde la relación entre $Mg+K/Ca$ es 20-50:1; mientras que en hojas esta relación es de 1-2:1 (Bangerth, 1974).

Woold ridge et al. (1974) apreciaron un incremento en la absorción de calcio cuando existía suficiente boro en el sustrato. En la misma línea, Lidster et al. (1975) y Zude (1997) encontraron una correlación negativa entre la incidencia de bitter pit y concentraciones crecientes de boro, y más recientemente Granelli y Ughini (1988) han demostrado una influencia positiva de la fertilización con boro sobre algunas características determinantes de la calidad del fruto. En este sentido cabe destacar los trabajos publicados por Wojcik et al. (1999; 2000) que demuestran los beneficios de la fertilización con boro.

Estudios realizados sobre la composición mineral de distintos órganos han demostrado que la concentración de calcio en fruto a comienzos de julio, no puede preverse basándose en los valores en hoja de muestras tomadas en mayo o a finales de junio, y que la única vía para conocer la composición mineral del fruto es a través de su propio análisis químico (Marcelle, 1990)

Por último, Marcelle (1993) y Tomala (1997) destacan la necesidad de un control estricto de las relaciones K/Ca y N/Ca (Ben, 1997) como parámetros a considerar dentro de la relación nutrición mineral-fruto.

1.3.2.2. Carga de cosecha y crecimiento vegetativo

El tamaño del fruto ha sido considerado como un factor importante en la incidencia de bitter pit. Los frutos grandes se ven más afectados que los de menor tamaño (Sharples, 1964; Volz et al., 1993; Retamales y Lepe, 2000).

Altas densidades de cosecha producen una mayor concentración de calcio tanto en frutos como en hojas; por ello, los frutos pequeños presentan menor incidencia de bitter pit (Chiu y Bould, 1977); de hecho Broom et al., (1998) encuentran una relación inversa entre el tamaño de fruto y su concentración en calcio. Sin embargo, el tamaño de fruto pequeño no es muy apreciado en el mercado.

Considerando un árbol en su conjunto, la relación superficie foliar/carga de cosecha es un parámetro que puede muy bien reflejar tanto el cuajado del fruto como las condiciones nutricionales en que se ha desarrollado su crecimiento. Por consiguiente, incidiendo sobre los componentes de la citada relación se podrá influir de manera directa sobre el proceso de división celular o de alimentación de la planta, y en consecuencia, sobre el tamaño medio del fruto. En este sentido, ya Sharples (1964) apuntó que, en general, otros factores y no sólo el tamaño, eran responsables de la mala calidad de los frutos procedentes de árboles con bajas cosechas. De igual forma, Link (1973) señaló que el tamaño no se podía considerar un factor importante con respecto a la susceptibilidad del fruto al bitter pit, sino que la incidencia dependería más de la relación hoja/fruto y, en particular, de la intensidad del crecimiento vegetativo durante los primeros meses del ciclo anual.

1.3.2.3. Patrón

Las características genéticas de las raíces son factores importantes en los cultivos porque determinan su vigor, tolerancia a diferentes tipos de suelo y de ambientes, resistencia a enfermedades cuyo origen está en el suelo, compatibilidad con la variedad, asimilación y equilibrio de nutrientes y, finalmente, a factores de producción como la calidad del fruto y la de cosecha (Westwood et al., 1973).

Blasco (1976) fue uno de los pioneros en el estudio de la influencia del

portainjerto sobre el porcentaje de bitter pit. Lewis et al. (1977) estudiando la composición química de hojas y frutos demostraron igualmente que estaba influenciada por el patrón.

También fue comprobada la influencia que ejerce el patrón sobre las concentraciones de otros nutrientes como N, P, K, Mg y Mn (Duarte, 1993). Posteriormente Ben (1995) demostró que la susceptibilidad al bitter-pit depende de la combinación patrón/variedad. Este autor encontró menor incidencia de la fisiopatía en los frutos de árboles menos vigorosos.

Estos resultados permiten suponer que el portainjerto ejerce una influencia selectiva sobre la traslocación de ciertos elementos, en particular el calcio, con la consiguiente repercusión sobre el desarrollo posterior del bitter pit.

1.3.2.4. Reguladores de crecimiento

El metabolismo del calcio está también influenciado por determinadas fitohormonas. Según Dekock et al. (1982), durante el crecimiento de la planta se producen una serie de hormonas, como las citoquininas, que inducen la disminución del nivel del calcio, mientras que otras, como el ácido abscísico, inhibidor del crecimiento, tienen el efecto opuesto.

Los reguladores del crecimiento pueden influir en el desarrollo del bitter pit a través de cuatro vías de actuación:

1. Controlando el vigor vegetativo y, por consiguiente, reduciendo la competencia por el calcio.
2. Reduciendo el tamaño del fruto.
3. Actuando sobre la maduración.
4. Controlando la movilización de nutrientes.

La aplicación de inhibidores como la daminozida o el paclobutrazol provoca, en los manzanos, aumentos en los niveles de calcio en hoja y en fruto

(Miller y Swietlik, 1986) al contrario que las giberelinas que pueden reducirlos (Looney, 1979).

1.3.2.5. Balance hídrico

La experiencia demuestra que en los veranos secos la incidencia el bitter pit es mayor que en los húmedos. Foschessati (1975) encontró una relación muy estrecha entre contenido cálcico de frutos y hojas y la cantidad total de agua suministrada a las plantas, de forma que la máxima concentración de nutrientes correspondería a los árboles que habían recibido un volumen de agua óptimo a lo largo del período de crecimiento. Saure (1996), también sugiere que el estrés hídrico que pueda sufrir el fruto, especialmente en post-cosecha, puede desencadenar los mecanismos que promueven el bitter-pit. Sin embargo, en estudios realizados con distintos niveles de irrigación en macetones, Failla et al. (1990) concluyen que un ligero déficit hídrico reduce la aparición de bitter pit, con un efecto muy escaso sobre el tamaño del fruto y un fuerte control sobre el crecimiento vegetativo.

1.3.2.6. Prácticas culturales

Son recomendables podas no muy severas y también poda verde en verano o un despunte 3 ó 4 semanas antes de la recolección, debido a la fuerte competencia por nutrientes entre brotes y frutos. Con esta práctica se consigue aumentar la concentración de calcio en el fruto en aproximadamente un 10%, lo que ocasiona un fuerte descenso en la enfermedad de frutos almacenados (Preston y Perring, 1974).

Además se recomienda efectuar aclareos adecuados, con el fin de obtener un buen número de frutos no demasiado grandes (Olivier et al., 1994), para evitar, en la medida de lo posible, el bitter pit y asegurar un buen nivel de floración para el año siguiente.

1.3.2.7. Recolección del fruto

El estado de madurez del fruto en el momento de la cosecha tiene influencia sobre la incidencia del bitter pit. Así, cuando se realiza antes de tiempo, se desarrolla bitter pit y la coloración de la piel cambia hasta adquirir un tono amarillento. Por el contrario, una recolección tardía produce una descomposición interna del corazón (Murga y Palazón, 1984). Perring y Pearson (1987), encontraron que la menor incidencia se producía cuando los frutos se recolectaban después de la iniciación del climaterio.

1.3.2.8. Prácticas post-cosecha

Las manzanas, como otras frutas, una vez recolectadas pueden ser destinadas a consumo en fresco, a distintas industrias de transformación o, a almacenarse durante un periodo de tiempo más o menos prolongado.

Aunque las condiciones de almacenamiento no inciden directamente en la aparición de bitter pit, en general, las prácticas orientadas a mantener una baja tasa de respiración, provocan una maduración más lenta, retrasando el comienzo de la enfermedad. Además, se recomienda mantener los frutos en la oscuridad, ya que la luz provoca el desplazamiento de determinados compuestos, desde otras partes del fruto hacia la piel, lo que se considera un iniciador de la enfermedad (Andris et al., 2000).

Los frutos cosechados son materia viva que utilizan O_2 y sustancias almacenadas y desprenden CO_2 en el proceso de respiración. La intensidad de la respiración varía con el estado de madurez, la clase de fruto, la temperatura, los tratamientos químicos y la composición de la atmósfera a su alrededor. Tanto antes como después de la recolección, los frutos sufren una compleja serie de reacciones bioquímicas controladas enzimáticamente, tales como la conversión de almidón en azúcar, la transformación de los hidratos de carbono, el uso de azúcares en la respiración, la disminución de ácidos orgánicos, los cambios en los

compuestos pécticos y la producción de compuestos volátiles (Westwood, 1982).

Para que las manzanas presenten una óptima calidad tras un almacenamiento prolongado, es necesario que la recolección de los frutos se haya realizado con el grado de madurez adecuado. Las manzanas recolectadas en un estado excesivamente inmaduro conservan bien su consistencia durante el almacenamiento, pero su color, aroma y sabor no evolucionan lo suficiente y además presentan con frecuencia desórdenes fisiológicos al salir de las cámaras, especialmente escaldado superficial y/o mancha amarga (bitter pit). Cuando la fruta se recoge excesivamente madura es muy susceptible a las lesiones físicas y a la aparición de vitrescencia (water core). Al finalizar el almacenamiento, las manzanas que se han cosechado demasiado maduras, se alteran rápidamente; presentan un aspecto poco atractivo; son excesivamente harinosas y están muy blandas. En consecuencia, es imprescindible proceder a la recolección del producto cuando éste reúne las características más adecuadas para mantener su calidad durante el almacenamiento.

La temperatura es el factor crítico que más influye en el mantenimiento de la calidad del producto. Su control ha de mantenerse en todas las fases de la vida comercial de la fruta, desde que se recoge hasta que se consume, pasando por el almacenamiento, transporte, etc. Como la tasa respiratoria de las manzanas varía directamente con la temperatura, la duración de la conservación varía inversamente con la misma. Generalmente el fruto almacenado a 15,6°C respira con una intensidad mayor que si se almacena a 0°C. Así la conservación a baja temperatura prolonga la vida efectiva del fruto mucho más tiempo que el almacenamiento a temperatura ambiente. No obstante, la capacidad de conservación del frío es limitada y para prolongar el tiempo de almacenamiento, es necesario completar la técnica de refrigeración con las atmósferas controladas (AC).

En los últimos años se ha producido una enorme expansión en el empleo de

las técnicas AC, principalmente como respuesta a la creciente demanda del mercado de productos frescos en todas las épocas del año. El aire contiene un 78,08% de N₂, un 20,95% de O₂ y aproximadamente un 0,03% de CO₂. Las atmósferas controladas son simplemente una modificación de la composición atmosférica, de forma que la atmósfera de almacenamiento sea distinta de la del aire. La modificación consiste en reducir los niveles de O₂ e incrementado el CO₂. La recomendación de composición media es de 1,6% de O₂ y 2,3% de CO₂ a 0,5°C.

Numerosos investigadores (Herregods, 1993; Kupferman, 1997; Meheriuk, 1993) han estudiado las ventajas e inconvenientes que presenta la utilización de atmósferas controladas. Entre los beneficios se podrían destacar los siguientes: la reducción de la intensidad respiratoria y del máximo climatérico; el aumento de los periodos de tiempo preclimatérico y climatérico del fruto, lo que permite recolectar la manzana en un estado fisiológico más cercano a la madurez sensorial; la reducción de los efectos del etileno en los frutos climatéricos y consecuentemente un retraso en la senescencia; la limitación de la pérdida de peso y disminución de los procesos de arrugamiento de los tejidos; el mantenimiento de la firmeza del fruto; la disminución más lenta de los contenidos en azúcares, ácidos y vitamina C; el retraso en la degradación de clorofilas y síntesis de pigmentos (carotenoides y antocianos); la limitación total o parcial de las alteraciones fisiológicas, como los daños por el frío, escaldados, pardeamientos, etc.; y la reducción del desarrollo microbiano, consecuencia de la acción fungistática y bactericida.

Entre los inconvenientes de las atmósferas controladas, cabría mencionar la maduración irregular de algunas frutas con determinadas concentraciones de O₂ y CO₂; una posible respiración anaerobia por muy bajas concentraciones de O₂ que provoca sabores y olores anormales; el agravamiento de la aparición de ciertas alteraciones fisiológicas; y el desarrollo de podredumbre debido a concentraciones

de O₂ muy bajas o muy altas de CO₂.

1.3.3. Diagnóstico y corrección del Bitter Pit

Existen algunos parámetros que pueden estudiarse con el fin de conocer, antes de la recolección o en ese mismo momento, la posible incidencia de bitter pit (Marcelle, 1993).

Uno de ellos es el estudio de la relación foliar K/Ca que cuando desciende por debajo de 2 indica que el factor de riesgo de aparición del bitter-pit aumenta considerablemente. Si el valor de la relación K/Ca en fruto aumenta por encima de 25, en unas fechas situadas entre los 80-100 días tras la plena floración, momento que coincide con el de máximo crecimiento del volumen de fruto (Aznar et al., 1999), es muy probable que aparezca bitter pit.

Es importante tener en cuenta, estos resultados porque podría actuarse sobre los árboles unos 50 días antes de la cosecha, bien sea para aplicar medidas correctoras o para destinar la cosecha, o parte de ella, al consumo directo. Esto constituye un método de prognosis muy eficaz, ya que con un solo muestreo en la fecha crítica se podrían determinar los árboles en los que muy posiblemente aparecerá bitter-pit (Val et al., 2000).

También se ha desarrollado un método de *Detección precoz de Bitter-pit*, fácilmente utilizable por los agricultores capaz de revelar de forma sencilla, rápida y visual la presencia de calcio y su distribución dentro del fruto (J. Val., Patente española nº 9802443). Mediante su uso podrían discriminarse, antes de entrar en la cámara de conservación, las partidas de manzanas con menor contenido en calcio y por lo tanto potencialmente susceptibles de sufrir bitter-pit. Esto supondría evitar cuantiosos costes debidos a las mermas en la producción, tiempo de almacenamiento (en cámara) y mano de obra necesaria para la selección, a mano, de la fruta en el momento de su salida al mercado.

Este procedimiento nos ha permitido concluir que se produce una acumulación de calcio en las áreas afectadas por la fisiopatía, lo que obliga a replantear que el bitter-pit se deba a una deficiencia de calcio localizada (Val et al., 1999).

2. Objetivos

En la actualidad, la calidad es el parámetro clave en la comercialización de los productos agroalimentarios. El bitter pit es la fisiopatía que ocasiona mayores pérdidas en la producción de manzanas y, a pesar de los numerosos estudios científicos realizados, no se conocen, con certeza, las causas que desencadenan su aparición.

En este trabajo se trata de profundizar en el conocimiento de bitter-pit y las causas que lo desencadenan. Para alcanzar este fin se plantea la consecución de los siguientes *Objetivos* parciales:

Objetivos agronómicos:

1. Verificar las posibles relaciones del bitter pit con: la carga de cosecha del árbol, aspersiones foliares de calcio y regulares de crecimiento. Además, se estudiarán los efectos de dichos tratamientos en el desarrollo morfológico del fruto y en su calidad.
2. Estudiar, desde el punto de vista evolutivo, el comportamiento de los nutrientes minerales en hoja y en fruto, incluyendo el diagnóstico del estatus nutricional de la plantación aplicando el método DOP en ambos tejidos.
3. Evaluar el uso del análisis floral como herramienta de diagnóstico nutricional, no solo con relación al tejido foliar sino al del fruto.

Objetivos fisiológicos:

1. Profundizar en las causas que desencadenan el bitter-pit mediante el estudio de la composición de las manchas características de la fisiopatía, comparándola con la de las zonas sanas adyacentes a las manchas y con tejido sano de manzanas no afectadas.
2. Estudiar la distribución de nutrientes en distintos tejidos de frutos sanos y afectados, con el fin de profundizar en los procesos de transporte de dichos nutrientes.

3. Investigar la posible existencia de gradientes tridimensionales de concentración, de las especies anteriormente mencionadas, en el volumen del fruto.

Los resultados que se deriven de este trabajo, además de contribuir a aumentar el acervo de conocimientos básicos sobre el bitter pit, podrían ayudar a establecer alguna de las bases que permitan alcanzar una solución práctica al problema.

3.

3.1. **Material vegetal (manzano)**

Esta especie frutal (*Malus domestica Borkh*) pertenece al orden *Rosales*, dentro del cual está incluida la familia *Rosaceae*, y por debajo de ésta, la subfamilia *Maloideae* (Ascaso, 1994).

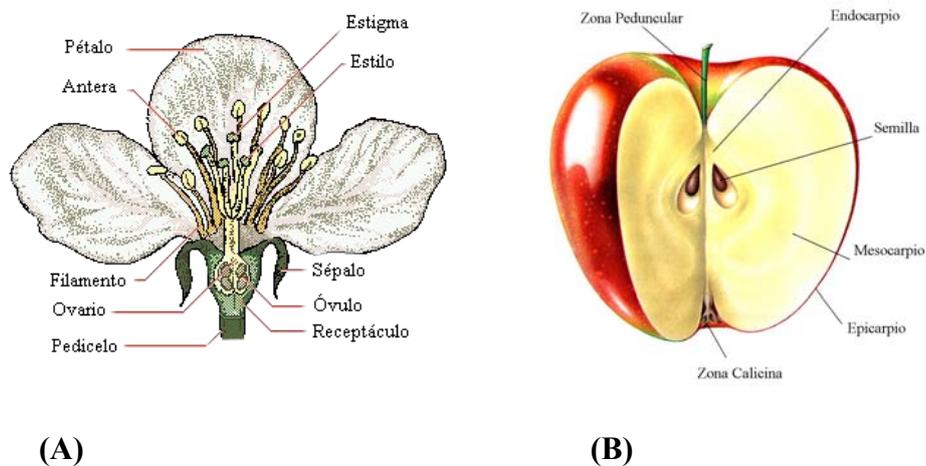
El manzano es un árbol caducifolio distribuido por las regiones templadas que se cultiva por sus frutos desde hace muchos siglos.

No se conoce con seguridad el lugar de origen del manzano, pero es probable que el árbol proceda de la región comprendida entre los mares Negro y Caspio. En asentamientos prehistóricos descubiertos en los lagos suizos, se han hallado restos carbonizados de manzanas. También existen referencias de la predilección de griegos y romanos por el consumo de este fruto.

La manzana llegó a América de la mano de los primeros colonos, que llevaron consigo semillas del árbol. Se conservan documentos de la Massachusetts Bay Company, de Estados Unidos, que demuestran que en Nueva Inglaterra ya se cultivaba el manzano en 1630. Indígenas, misioneros y comerciantes llevaron las

semillas hacia el oeste de los nuevos territorios. En España fue introducida por pueblos del Norte de África y durante el proceso de romanización de la península. Históricamente restringida en superficies muy limitadas en la cornisa cantábrica y en algunas áreas de montaña, empezó su expansión en las huertas de algunas vegas de ríos. Sin embargo, no fue hasta mediados de los años 50 o inicios de los 60, cuando paralelamente a la posibilidad de la frigoconservación del fruto, por largos períodos de tiempo, empezó una verdadera expansión industrial, doblándose prácticamente la superficie cultivada desde 1960 hasta 1985.

El manzano tiene un porte natural globoso, erguido y extendido y con tendencia a inclinarse con el paso de los años. La corteza del tronco es agrietada y de color marrón grisáceo. Las hojas del manzano son simples, de forma oval, alternas y de 4 a 13 cm de longitud. Tienen el borde dentado, son algo coriáceas y de color verde intenso por el haz, cubiertas de fina pubescencia pálida por el envés, con peciolo bien notorio y dos estípulas caedizas en la base.



(A) **(B)**
Figura 13: Parte de un manzano: (A) sección logitudinal de la flor (B) sección longitudinal del fruto

La inflorescencia es un corimbo que tiene entre ocho y once flores. Los botones florales pueden ocupar una posición terminal en la ramilla o una posición

lateral sobre la madera del año. Cada botón floral, tiene en su base dos yemas de madera. Las flores hermafroditas (*Figura 13*), que pueden observarse entre abril y mayo, están formadas por cinco pétalos blancos en el interior y ligeramente rosados por fuera que dan lugar a inflorescencias en forma de umbela. Los cálices de cinco puntas son verduscos y tomentosos. El ovario es ínfero, ligeramente tomentoso con cinco estilos conatos en la base y entre 10-30 estambres rodeando al ovario que suelen ser amarillos.

Generalmente el manzano es autoestéril y necesita, por ello, una polinización cruzada con otras variedades compatibles y la ayuda de las abejas.

El fruto (*Figura 13*) cuya fecha de recolección, en el hemisferio norte, va desde finales de agosto hasta finales de septiembre o principios de octubre, según variedades, tiene forma de pomo, contiene dos cavidades, la calícina correspondiente al cáliz de la flor y la peduncular donde se inserta el pecíolo que lo une al brote. El fruto está compuesto por el epicarpio, que puede variar desde el verde hasta el rojo oscuro casi parduzco; el mesocarpio o pulpa, de consistencia cualidades organolépticas variables (desde el ácido, hasta muy dulce); y el endocarpio, con cinco cavidades cartilaginosas que contienen de 1-2 semillas cada una (Sanz, 1994), ya que cada ovario contiene 2 óvulos. El pedúnculo del fruto es de longitud variable, adherente y a menudo está inserto en una depresión (Coutanceau, 1965).

La composición química del fruto es aproximadamente el 84% de agua, 14% de glúcidos, entre ellos glucosa y fructosa, un 1,5% de ácidos orgánicos como el málico, cítrico, tartárico, y luego, en muy pequeñas cantidades, pero no por ello menos importante fenoles, lípidos, próticos, pectinas y vitaminas A y C (Carreras, 1999).

Este frutal se propaga de forma vegetativa por injerto de yema y, generalmente, fructifica en lamburda o brindilla.

La gran variabilidad genética del género *Malus* así como la existencia de mutantes permiten una buena adaptación a climas muy diversos. Aunque no cabe duda que existen unas condiciones climáticas óptimas para su mejor desarrollo, como son las zonas templadas o ligeramente frías (León, 1991), ya que resisten bastante bien las heladas y el clima seco, aunque para ello sea necesario el riego.

Las mejores condiciones edafológicas para el cultivo del manzano son suelos bien drenados y, aunque es menos sensible a la caliza activa que otras especies, también acusa contenidos altos de la misma. La principal limitación para el cultivo del manzano en comarcas meridionales es el requerimiento en horas frío (a partir de 1000), las heladas primaverales y el granizo. Las elevadas temperaturas durante el verano y la falta de contraste térmico entre la temperatura diurna y nocturna, limitan el desarrollo del color y consecuentemente la producción de fruta de calidad en ciertas variedades. La disponibilidad del agua durante el ciclo de cultivo es otro de los condicionantes fundamentales para la producción de manzana en climas meridionales, restringiendo el cultivo a los valles de ríos, zonas de regadío (las más frecuentes) o áreas con suficiente pluviometría.

Según el Centro de Protección Vegetal de la Diputación General de Aragón, las plagas y enfermedades más frecuentes en el manzano son: agusanado o barrenado, araña roja, barrenado de la madera y del tronco, fuego bacteriano, **mancha amarga o bitter pit**, minadora circular, minadores de hoja, moteado, oidio, orugas de la piel, pulgón lanífero, pulgón oscuro y rugosidad del fruto. En los últimos años se han invertido importantes esfuerzos en programas de control integrado de plagas que, más recientemente, ha desembocado en líneas de producción integrada de fruta en Cataluña y Aragón (Bonany, 2001).

En esta última referencia se enumeran las variedades de manzano más utilizadas en España. El grupo más cultivado es *Golden Delicious*, que actualmente ocupa un 57% de la superficie. En los últimos años se están

utilizando clones menos sensible al “russetting”, como *Golden Smoothie*. El segundo grupo en importancia, es el de variedades rojas americanas, con un 14%. Destacan *Early Red One*, con coloración lisa y *Red Chief*, con coloración estriada. La manzana *Granny Smith* constituye el tercer grupo de variedades más plantadas, siendo muy utilizada como polinizador de las anteriores. Las variedades *Royal Gala*, *Mondial Gala* y *Galaxy* constituyen el grupo Gala que es el que más ha crecido en los últimos años, en cuanto a superficie plantada. Recientemente se ha suscitado un fuerte interés por otro tipo de variedades como la *Fuji* o la *Pink Lady*.

Las manzanas se consumen en fresco, usualmente después de un período de frigoconservación convencional o en atmósfera controlada. También se usa la manzana para elaborar sidra y otras bebidas alcohólicas, así como confituras, vinagre y zumos.

3.1.1. Patrón y variedad

En este trabajo se ha utilizado la variedad *Golden Smoothie* sobre patrón M9. Las características más importantes que el patrón debe transferir a la planta son: vigor, adaptación a diferentes condiciones de suelo y clima, resistencia a plagas y enfermedades, precocidad, productividad, anclaje y facilidad de propagación.

El patrón clonal M9 pertenece a la serie East Malling Merton. Es una selección de una población conocida como Jaune de Metz. Se encontró en Francia a finales del siglo XIX y todavía hoy sigue siendo el patrón más utilizado en todo el mundo. Esta popularidad, se debe a su moderado nivel de crecimiento, alta fertilidad y buen tamaño de fruto que induce en las variedades. Su resistencia a la podredumbre del suelo es un factor importante, sin embargo, este patrón es exigente en suelo, vulnerable al estrés hídrico, a las heladas invernales, y susceptible al fuego bacteriano.



Figura 14: Variedad de manzano Golden Smoothee injertado sobre el patrón M9 de la serie East Malling Merton

Los árboles son de pequeño tamaño (25 - 35 % de un árbol procedente de semilla). Sus brotes son robustos, rectos, con altura y diámetro medio. La corteza es rojiza plateada, ligeramente vellosa. Las hojas son ovaladas-oblongas, coriáceas, espesas y oscuras. Produce relativamente poca madera para el soporte de cosecha, lo cual indica que un elevado porcentaje de asimilados fotosintéticos

se destina a la producción de fruta y poco a la producción de madera (Tuckey, 1964). Es destacable su eficiencia productiva (producción acumulada/sección de tronco).

Posee un anclaje débil y sus raíces son quebradizas y se rompen fácilmente, lo que hace necesario el uso de un soporte, particularmente durante los primeros años. Se utiliza en plantaciones de alta densidad por su pequeño tamaño, precocidad y productividad (Carlsson y Rom, 1987).

Es poco sensible a *Phytophthora* y medianamente sensible a *Agrobacterium* y a asfixia radicular.

3.1.2. Prácticas culturales

La plantación se realizó en 1987, con un marco de 4 x 2. Los árboles están podados en eje central libre. El espacio entre líneas está ocupado por pradera permanente a la que se realizan varios cortes a lo largo del año para no dificultar las tareas de cultivo y mantener los árboles en un estado óptimo. En las líneas se aplican herbicidas.

El sistema de irrigación es por inundación desde acequias de riego localizadas en los márgenes de las parcelas. La frecuencia es mensual o algo inferior en función de los datos climáticos y las necesidades instantáneas del cultivo. El agua de riego utilizada proviene del río Ebro a su paso por Quinto. Este agua aunque posee una salinidad ligeramente alta, es apta para el cultivo.

El abonado de la parcela es el aplicado habitualmente. En primavera se aplica nitrato amónico a razón de 200 Kg/ha que se complementa con un abono foliar binario. A mitad de verano se aplica Nutrichen con una proporción N:P:K en función de las necesidades y en el mes de octubre se realiza una aplicación de sulfato de cinc.

Además del abonado, para mantener la plantación en perfectas condiciones sanitarias es imprescindible controlar las posibles plagas y enfermedades. Para

ello se lleva un riguroso calendario de tratamientos fitosanitarios mediante la aplicación de productos comerciales.

3.1.3. Características del suelo

El suelo es xerofluvent típico, con una textura franco-arcillo-limosa en el perfil que ocupa la zona radicular. El pH medio es de 8.15 con un contenido medio en materia orgánica en suelo de un 38 %, en la capa arable.

La conductividad del extracto saturado es de 6 dS/m a 25°C. Esta conductividad se debe a la presencia de yesos y de sodio (contenido medio 25 meq L⁻¹).

La roca madre está constituida por depósitos aluviales del río Ebro y presenta una gran variabilidad por intensas nivelaciones. Los horizontes presentes en el perfil del suelo se describen a continuación según la profundidad a la que se encuentran.

A la profundidad de 0 a 30 centímetros encontramos un horizonte Ap. La textura es franco-arcillo-limosa, con manchas y depósitos de yesos. Este horizonte presenta una transición difusa y horizontal con el horizonte inferior. Existe abundancia de raíces, caracoles y lombrices. También hay gran cantidad de canalículos. La pedregosidad es del 2% sin gravilla. En el momento de la observación está húmedo, plástico y pegajoso. Tiene estructura migajosa y presenta compacidad II.

A una profundidad de 30 a 90 centímetros existe un horizonte B. La textura es franco-arcillo-limosa. También presenta abundancia de raíces, caracoles y lombrices. En este caso, la transición con el horizonte inferior es neta. Existe gran cantidad de poros y canalículos, y abundantes depósitos de yesos. La pedregosidad es del 2% con un 2% de gravilla. Presenta estructura subpoliédrica con una compacidad III.

A más de 90 centímetros de profundidad el horizonte es B/D. La textura es franco-arcillosa. No hay presencia de raíces ni fauna, y no presenta piedras ni grava. Es muy compacto con abigarrado de colores grises y ocre y es el límite de la explotación radicular porque impide un drenaje libre.

3.2. Localización del ensayo y diseño experimental

3.2.1. Localización

El estudio se realizó en material procedente de la finca el Cerradico situada en la localidad de Quinto de Ebro (Zaragoza), zona que corresponde al Valle Medio del Ebro y que es representativa del cultivo de manzano en Aragón.

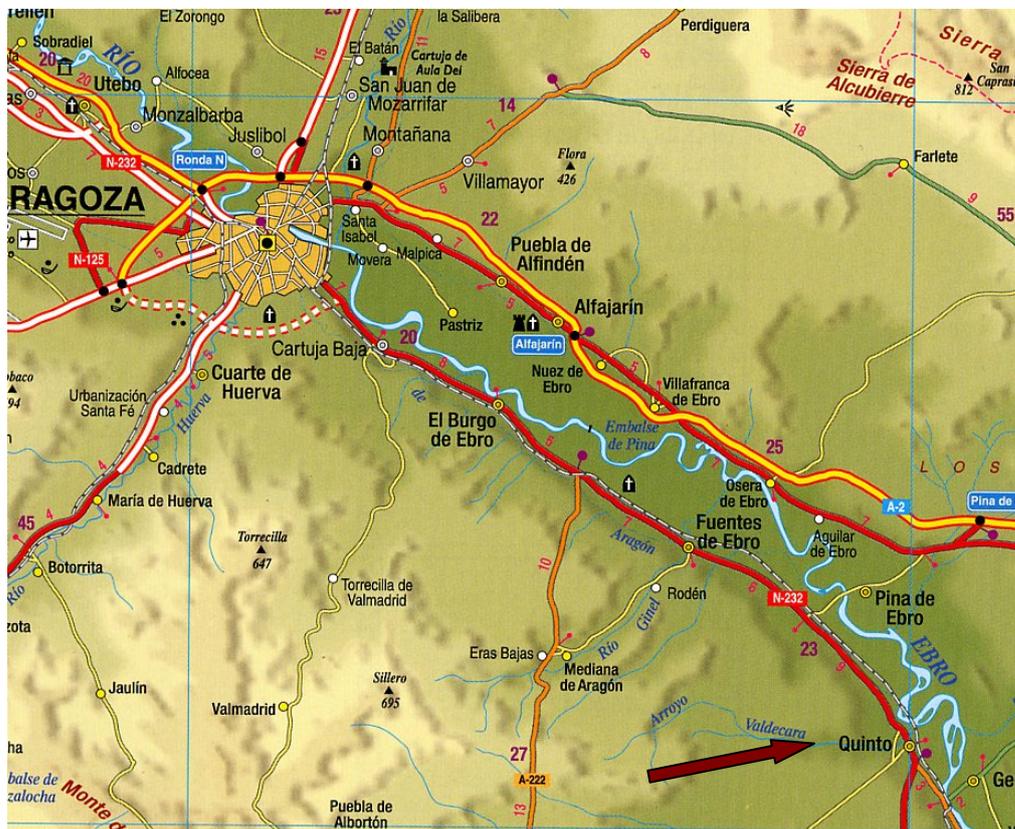


Figura 15: Localización de Quinto de Ebro, término donde se ubica la finca El Cerradico

3.2.2. Tratamientos y diseño Experimental

El ensayo se realizó en distintas parcelas de la misma finca para evitar los posibles efectos memoria entre un año y el siguiente.

Las parcelas fueron divididas en bloques de forma transversal respecto a los posibles gradientes que se podían dar en ellas.

3.2.2.1. 1997

En el primer año se establecieron cuatro tratamientos con cinco repeticiones cada uno, es decir un total de 20 árboles. Los tratamientos consistieron en variar el nivel de cosecha, mediante el aclareo de frutos y en la aplicación de calcio a la parte aérea del árbol mediante aspersiones foliares con CaCl_2

El diseño factorial 2x2 utilizado se muestra en la *Tabla 1*:

Tabla 1: Diseño experimental en 1997

Nivel de Cosecha	Control	CaCl_2
No aclareo	1	2
Aclareo	3	4

La distribución de los tratamientos se hizo como bloques al azar con 5 repeticiones.

Debido al elevado cuajado inicial, para mantener los manzanos en condiciones óptimas, previamente al aclareo manual, se les aplicó un aclareo químico con ácido naftalenacético (NAA) sobre los cuatro tratamientos. Los árboles de todos los tratamientos recibieron las mismas prácticas culturales a excepción de las específicas del diseño experimental.

Los datos evaluados fueron: parámetros biométricos como el área foliar, peso fresco y seco de hojas y frutos y carga de cosecha en recolección; nivel de clorofila foliar; análisis mineral en hoja y fruto; carbohidratos solubles y determinación cualitativa de calcio. Asimismo, se midieron los perímetros de troncos antes y después del ensayo, y durante la parada invernal. En recolección se cuantificó la cosecha árbol por árbol, se contó el número de frutos y se tomó una muestra representativa para su conservación en cámara y posterior evaluación del *bitter pit*

Las tomas de muestras se realizaron según se detalla en el calendario siguiente:

Plena floración	84 DTPF
35 DTPF	123 DTPF
56 DTPF	144 DTPF
69 DTPF	Recolección

3.2.2.2. 1998

En el segundo año de experimentación en campo, se pretendió estudiar las relaciones entre crecimiento vegetativo y fructificación para investigar la distribución de calcio entre los distintos órganos de la planta.

Para ello se evaluaron distintas concentraciones del regulador de crecimiento Prohexadione-Ca y distintos niveles de cosecha, aplicados mediante aclareo de frutos según el diseño factorial 3x4 mostrado en la *Tabla 2*:

Tabla 2: Diseño experimental en 1998

Nivel de cosecha	Prohexadione-Ca			
	Control	125	250	125 x 2
No aclareo	1	2	3	4
Aclareo medio	5	6	7	8
Aclareo fuerte	9	10	11	12

Los tratamientos se aplicarán como bloques al azar con 4 repeticiones.

El aclareo de frutos se realizó en caída de pétalos y las aplicaciones de Prohexadione-Ca cuando los brotes medían entre 10 y 15 cm de longitud. Estas aplicaciones se repitieron a las 2 ó 3 semanas en los tratamientos 4, 8 y 12.

Los parámetros evaluados fueron crecimiento de brotes y de frutos, concentración de carbohidratos, área foliar y concentración de clorofila. Muestreo de hojas y frutos para análisis, una vez al mes. En recolección se cuantificó la cosecha árbol por árbol, se contó el número de frutos y se tomó una muestra representativa para su conservación en cámara y posterior evaluación del *bitter pit*. También se midieron los perímetros de tronco antes y después del ensayo, y durante la parada invernal.

Las tomas de muestras se realizaron según se detallan en el calendario siguiente.

Plena floración	95 DTPF
40 DTPF	116 DTPF
67 DTPF	Recolección

3.2.2.3. 1999

En el tercer y último año se planteó únicamente analizar el efecto del nivel de cosecha en relación con la distribución del calcio en el fruto.

Para ello los tratamientos se realizaron como bloques al azar con 6 repeticiones. De los 6 bloques, en tres de ellos se realizaron medidas *in situ* y en los otros tres se fueron tomando muestras que se analizaron posteriormente en el laboratorio.

Los parámetros evaluados fueron crecimiento de brotes y de frutos, concentración de carbohidratos, área foliar y concentración de clorofila. Muestreo de hojas y frutos para análisis, una vez al mes. En recolección se cuantificó la cosecha árbol por árbol, se contó el número de frutos y se tomó una muestra representativa para su conservación en cámara y posterior evaluación del *bitter pit*. También se medirán los perímetros de troncos antes y después del ensayo, y durante la parada invernal.

Las tomas de muestras se realizaron según se detallan en el calendario siguiente.

Plena floración	120 DTPF
30 DTPF	Recolección
70 DTPF	

3.3. Toma y preparación de muestras

3.3.1. Hojas

Del tercio medio de los brotes del árbol se tomaron unas 40 hojas aproximadamente. Tras varios lavados con detergentes exentos de fosfato y finalmente con agua destilada, el material se secó en una estufa en corriente de aire caliente (60 °C) durante 48 horas, hasta que el peso de la hoja se mantuvo

constante. Posteriormente se homogeneizó en molino para hojas y se pasó por un tamiz (60 mallas), obteniéndose así una molienda homogénea.

3.3.2. Frutos

En cada muestreo se tomaron 10 frutos al azar por toda la copa del árbol. Tras diversos lavados para eliminar residuos de tratamientos, los frutos troceados sin semillas se secaron en estufa de aire forzado a 60°C durante 7 días. Posteriormente se molieron y pasaron por tamiz para obtener un polvo homogéneo. En este proceso es importante el control de la temperatura para evitar la caramelización de la muestra y también el tiempo de secado para evitar la rehidratación.

3.3.3. Muestreo de regiones concretas de fruto.

Para estudiar la posible existencia de gradientes de concentración en fruto se utilizaron manzanas sanas y afectadas por bitter-pit.

3.3.3.1. En el plano ecuatorial

A una manzana se le realizaron dos cortes transversales de manera que se obtuvo una rodaja central de aproximadamente 2-3 cm. de grosor. Esta rodaja se dividió en 12 porciones T1a, T2a, T3a, T4a, T5a, T6a, T1b, T2b, T3b, T4b, T5b, y T6b (como se muestra en la *Figura 16*). Una vez realizados los cortes se tomó aproximadamente 1 g de pulpa de cada una de las respectivas zonas.

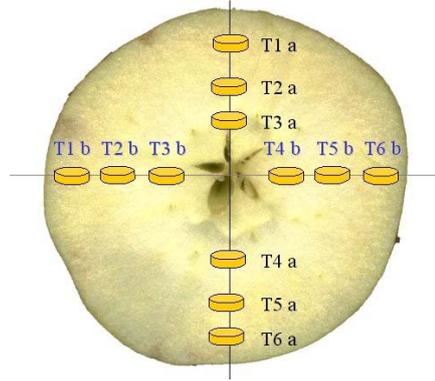


Figura 16: Corte transversal de una manzana y representación de las muestras tomadas para caracterizar los posibles gradientes transversales.

3.3.3.2. En el eje longitudinal

Para obtener muestras a lo largo del eje longitudinal de la manzana se realizaron dos cortes longitudinales para la obtención de una rodaja de espesor aproximado a la del corte transversal. Una vez obtenida la sección de fruto, se dividió en 5 porciones L1, L2, L3, L4 y L5. Para la obtención de 1g por muestra se tomaron 0.5 g a cada lado del eje longitudinal tal como se muestra en la *Figura 17*.

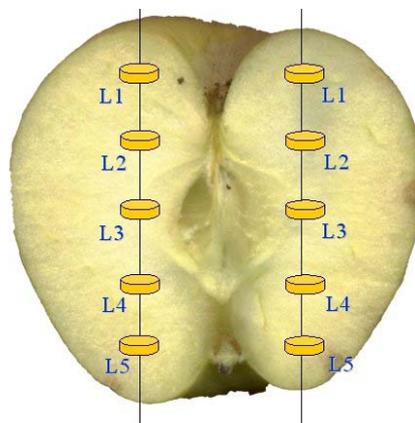


Figura 17: . Corte longitudinal de una manzana y representación de las muestras tomadas para caracterizar los posibles gradientes transversales.

3.4. Extracción de compuestos hidrosolubles

Esta técnica se utilizó para determinar la diferencia en nutrientes entre manzanas sanas y manzanas con bitter pit, así como para comprobar la existencia de gradientes de concentración de nutrientes en manzana.

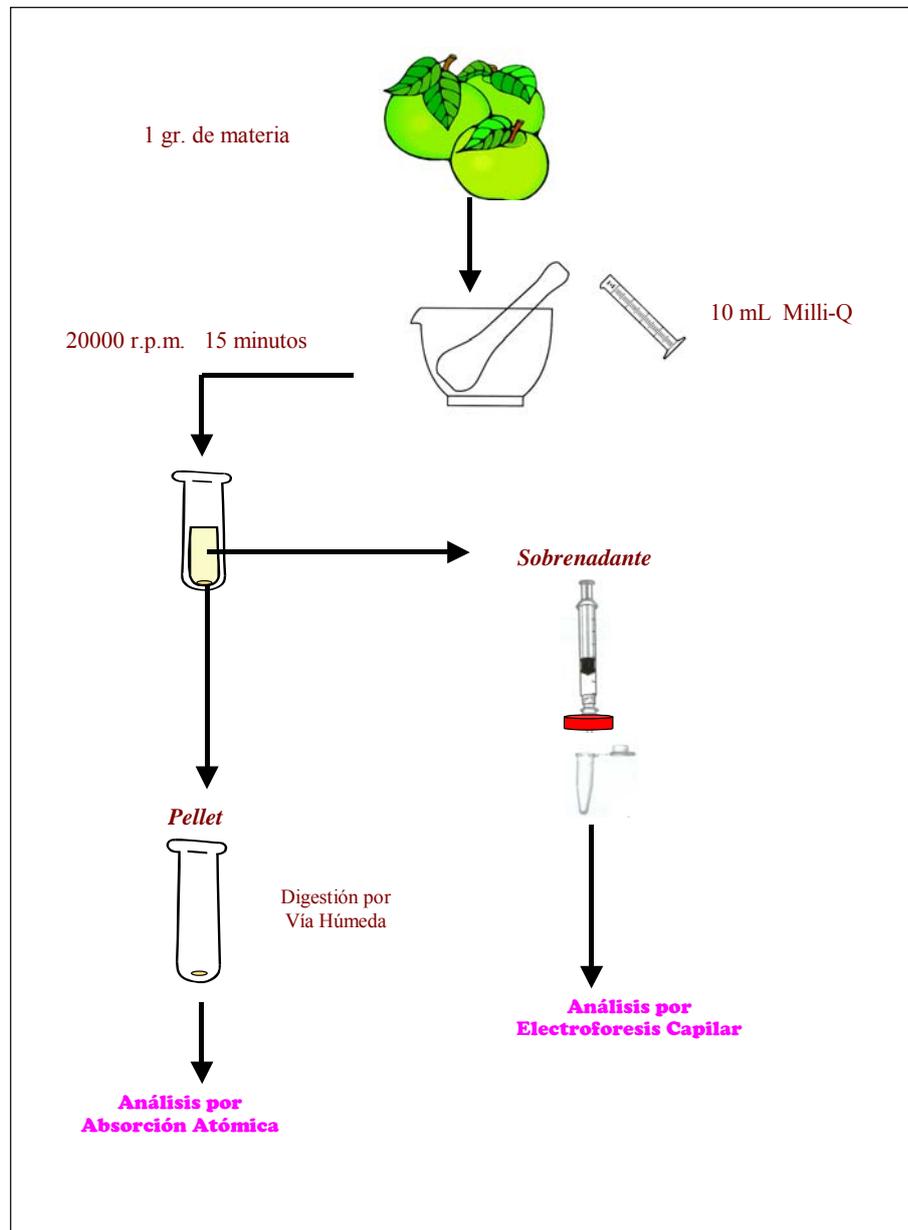


Figura 18: Esquema del proceso de una extracción de material hidrosoluble

El medio con el que se realizaron las extracciones consistió en agua ultrapura Milli-Q, en una proporción de 1gr muestra/10 mL H₂O.

En la *Figura 18*. se muestra esquemáticamente el proceso de una extracción.

El primer paso fue verter la muestra en un mortero y añadir el agua para homogeneizarla y humedecerla hasta la formación de un gel uniforme. A continuación se trasvasó la mezcla a un tubo de policarbonato y se procedió a la centrifugación (modelo R5C5 de Sorval Instruments) a 20000 rpm durante 15 minutos.

Al cabo de este tiempo, en el tubo, se observaron 2 fases diferenciadas: sobrenadante (fase líquida) y pellet (fase sólida). Mediante una pipeta Pasteur se tomó el sobrenadante y se filtró a través de un filtro bajo presión (sistema Tracer, de 0,45µm). Posteriormente, este sobrenadante se analizó por electroforesis capilar, para determinar las especies catiónicas (Ca²⁺, Mg²⁺ y K⁺) y aniónicas (inorgánicos y ácidos orgánicos). De esta forma es posible determinar la concentración de la parte soluble de los nutrientes de interés. Con el residuo seco se realizó una digestión húmeda para determinar la concentración de la parte insoluble (apartado 3.5.2).

3.5. Métodos de calcinación y digestión

3.5.1. Calcinación de Hojas y Frutos

Se utilizó el método propuesto por la AOAC (1980), que básicamente consiste en pesar 1 g de muestra para el caso de las hojas y 2 g para el de los frutos, del material molido y seco, en un crisol de porcelana. Los crisoles se introdujeron durante 24 horas en mufla a 600 °C, y las cenizas obtenidas se disolvieron, en campana extractora, con 4 mL de ácido nítrico comercial (70%) diluido 1:1 (v:v), consiguiéndose la total disolución de las cenizas mediante

calentamiento (100 °C) en placa calefactora. La disolución obtenida se evaporó hasta sequedad y el residuo se introdujo de nuevo en mufla (600 °C) durante una hora. Tras enfriar, las cenizas se disolvieron calentando en placa con 10 mL de ácido clorhídrico (65%) diluido 1:1 (v:v). Esta disolución se pasó a través de papel de filtro (Watman nº 9) enrasándose a 25 mL con agua destilada. La disolución se mantuvo a -4°C hasta su utilización.

3.5.2. Digestión de Tejidos de Fruto

Este método está basado en la oxidación y solubilización de la materia orgánica de la planta cuando se añade H₂O₂ y HNO₃ y se calienta durante un corto periodo de tiempo (Pequerul et al., 1993).

Esta digestión se utilizó para determinar la cantidad de Ca²⁺, Mg²⁺ y K⁺ insoluble en agua en manzanas sanas y manzanas afectadas por bitter pit.

Al material fresco se le añaden 5 mL de HNO₃ concentrado mientras se procede a la agitación para humedecer la muestra. A continuación y siguiendo con la agitación, se añaden cuidadosamente, bajo campana extractora, 4 mL de H₂O₂ al 30% y continúa agitándose durante 7-8 minutos. Esta vez la agitación se lleva a cabo a una temperatura de unos 100° C aproximadamente. Se deja enfriar hasta que dejan de desprenderse humos y la solución ligeramente amarillenta, es filtrada mediante un filtro de jeringa y enrasada a un volumen de 25 mL con agua Milli-Q.

3.5.3. Digestión por microondas

Gracias a la colaboración para realizar un Proyecto de Investigación subvencionado por la DGA, las muestras de hoja y fruto de la temporada 1997, se analizaron fuera de la Estación Experimental de Aula Dei, en concreto, en el Laboratorio Agroambiental de la Diputación General de Aragón, que también esta

ubicado en el Campus de Aula Dei. En este laboratorio se utiliza un digestor por microondas para realizar las calcinaciones del material vegetal.

Este método se basa en la radiación de baja longitud de onda que emite un microondas aplicado a recipientes cerrados y transparentes que contienen reactivos polares. De esta forma se produce la digestión ácida de las muestras y se rompen todas las moléculas orgánicas dejando, en forma libre, los elementos minerales que contiene la muestra.

En concreto, se parte de 0,4 g de muestra que se introducen en un tubo de cuarzo junto con 3 mL de peróxido de oxígeno y 4 mL de ácido nítrico. Se coloca el tubo en el rotor dispuesto para ataques en microondas y se aplica el programa necesario para su digestión. Una vez finalizada esta, el extracto se lleva hasta 20 mL con agua desionizada.

3.6. Medidas biométricas

A través de medidas biométricas se pretende obtener información del crecimiento vegetativo del árbol.

3.6.1. Peso seco y fresco de hojas

Las hojas de cada experimento, tras ser lavadas con agua destilada y despeciadas, se pesaron (P_f) en una balanza de precisión. Tras permanecer 48 horas en una estufa a 60°C, se determinó nuevamente su peso seco (P_s) para poder calcular el porcentaje de humedad según la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{P_f - P_s}{P_f} \times 100$$

Para conocer el peso específico de las hojas se determinó el peso fresco y seco de 10 discos de sección conocida (0.33 cm²). Su cálculo se realizó dividiendo el peso seco por la superficie total (mg cm⁻²)

3.6.2. Dinámica del crecimiento

Aunque las especies varían enormemente en sus capacidades asimilativas (C_4 vs C_3 , plantas expuestas a la luz vs sombra), existen controles de crecimiento innatos que ejercen fuertes efectos sobre sus funciones generales. El consumo físico mantiene el crecimiento, pero la regulación biológica dicta al patrón a seguir en su utilización y expresión final. Para entender la naturaleza de esta regulación en el conjunto de toda la planta y poder apreciar las interacciones entre la planta y su entorno, es preciso realizar medidas más detalladas y no solamente estudiar el resultado final. Estos parámetros pueden obtenerse a través del análisis de crecimiento, aplicando modelos matemáticos.

Para células individuales u órganos, el crecimiento es potencialmente ilimitado y comienza siguiendo un modelo exponencial (curva A). Sin embargo, las interacciones dentro de un mismo individuo imponen limitaciones en el crecimiento, y la curva se estabiliza siguiendo una sigmoidea (curva B). En la *Figura 19* se representa gráficamente este proceso.

El crecimiento de una planta superior, durante su fase exponencial, es análogo a la acumulación de un capital a interés compuesto. El embrión representa el capital inicial, mientras que la eficiencia fotosintética determina la tasa de interés. El crecimiento puede ser analizado como un incremento en el peso fresco o como una acumulación de materia seca. Cualquiera de los sistemas seguirá una ley de interés compuesto durante su primera fase exponencial. (Agustí, 2000). Por analogía, los microorganismos también muestran un crecimiento sigmoideo debido a las eventuales limitaciones de espacio, de nutrientes, o a una acumulación de productos finales. El crecimiento global de cualquier órgano u organismo incluye una primera fase exponencial (curva B). Parámetros tales como volumen, peso, área, altura, número de células, e incluso contenido proteico, todos siguen un patrón similar.

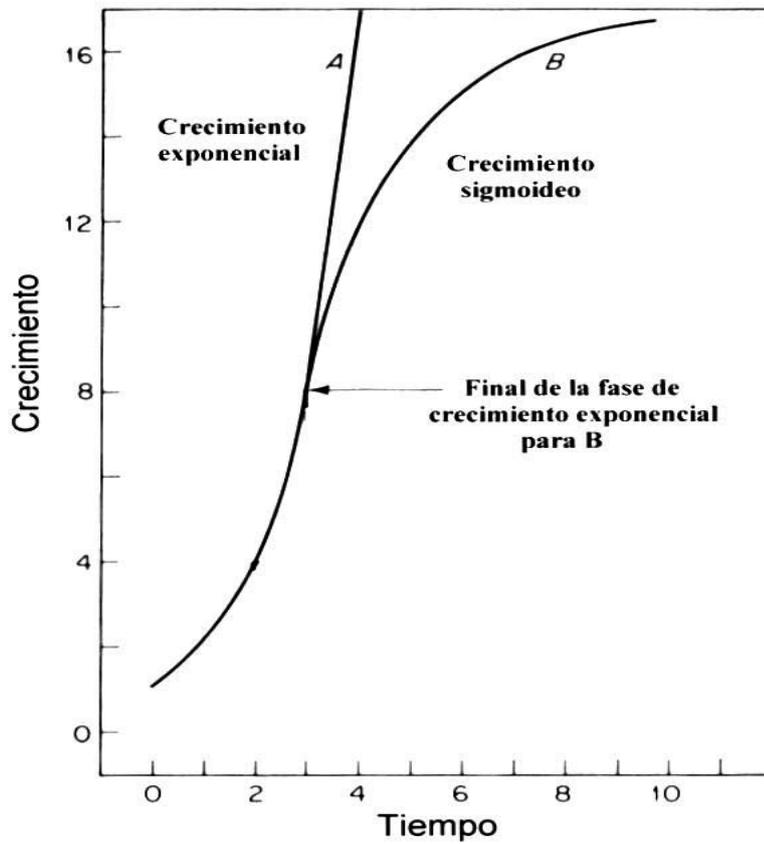


Figura 19: La primera fase del crecimiento de las plantas tiende a ser exponencial (curva A) aunque el modelo sigmoideo representa más adecuadamente el total del ciclo de la planta (curva B). (Leopold y Kriedemann, 1975)

En nuestro caso, los datos de crecimiento de peso seco y fresco de fruto fueron ajustados a una ecuación logística de crecimiento según el método matemático descrito por Costa y al. (1995).

$$y = \frac{C}{1 + e^{(-B*(x-M))}}$$

Donde y representa el peso fresco del fruto, X es el tiempo en días, C es el peso final y M el tiempo de máxima velocidad de crecimiento. La máxima velocidad de crecimiento es la tangente al punto de inflexión de esta curva y viene dada por:

$$\frac{B * C}{4}$$

Los parámetros obtenidos de cada ajuste sigmoideo fueron analizados estadísticamente.

3.6.3. Sección de tronco

Al principio y final de cada año se determinó el perímetro de tronco de los árboles a una altura de 20 cm del suelo para calcular el incremento relativo del perímetro y sección de tronco.

3.7. Parámetros de calidad del fruto

3.7.1. Carbohidratos totales por refractometría

Cuando maduran los frutos, el almidón se convierte en azúcares, primero en sacarosa y luego en glucosa y fructosa. Los azúcares son los principales componentes de los sólidos solubles del fruto, y la medida de éstos con un refractómetro está basada en la desviación de la luz polarizada al atravesar el jugo del fruto, y proporciona una medida suficientemente válida de los azúcares disueltos.

Este parámetro está influenciado por muchos factores, incluyendo las características de la parcela y el manejo cultural. El contenido de azúcares es la principal medida de la calidad interna del fruto ya que, junto con la acidez, condiciona el sabor del mismo. El estudio de la evolución de este parámetro es importante para la determinación de la fecha óptima de recolección.

El contenido de carbohidratos solubles se determinó con un refractómetro digital ATAGO PR-101. Su rango de medida va de 0 a 45 grados brix, con una precisión de $\pm 0,2\%$. Además, presenta un sistema automático de compensación de temperatura de la muestra para un rango de 5 a 40°C.

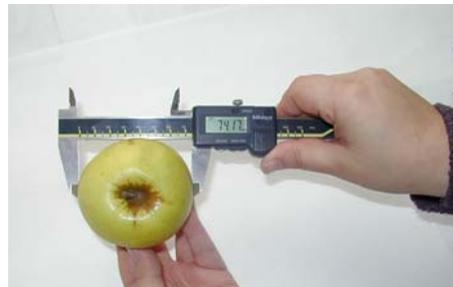


En cada muestreo, se utilizan 10 frutos por árbol. A cada uno de ellos se les realiza un corte longitudinal y otro transversal y se toma el jugo de ambas secciones para realizar sendas lecturas.

3.7.2. Tamaño del fruto

Para determinar el tamaño del fruto se efectúan medidas tanto de diámetro como de altura con la ayuda de un calibre digital de precisión Mitutoyo (mod Calipeter) unido a una memoria (Data Loger) que almacena los datos para su posterior tratamiento.

En cada muestreo se miden, de forma no destructiva, 20 frutos por árbol repartidos aleatoriamente alrededor de su copa y, además también se determinan calibre y altura en los 10 frutos recogidos para las determinaciones destructivas.



3.8. Determinación cualitativa de calcio en el tejido del fruto

Este procedimiento se basa en la reacción del calcio con reactivos específicos que permiten determinar *de visu* la existencia de calcio en los tejidos analizados.

La determinación cualitativa del contenido del calcio en los tejidos de manzana se ha realizado a través de un nuevo método desarrollado en nuestro laboratorio (Val, 1999; Pat. n° 9802443), que está basado en una sencilla reacción de desarrollo de color al poner en contacto una sección de manzana sobre un papel de filtro especial impregnado en unos determinados reactivos. Los pasos a seguir son los siguientes: se realiza un corte, transversal o longitudinal, en la manzana lo más perfecto posible. A continuación se mezclan Glioxalbis (2-hidroxi-anilo) sólido con etanol, cloroformo e hidróxido de sodio en una relación 5:5:1. Con una pipeta Pasteur se impregna un papel de filtro circular exento de calcio.

Seguidamente se presionará durante unos pocos segundos la superficie recién cortada de la manzana sobre el papel de filtro, se retira la manzana y aparece sobre el papel una coloración rojo-morada que indica la presencia de calcio en el tejido analizado.

La representación gráfica de este proceso puede observarse en las *Figura 20- Figura 24*.

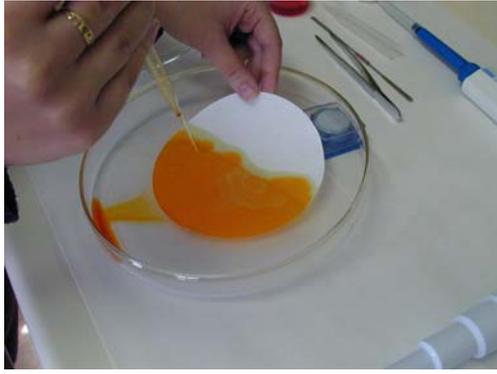


Figura 20: Aplicación del reactivo



Figura 21: Filtro impregnado y corte transversal de la manzana

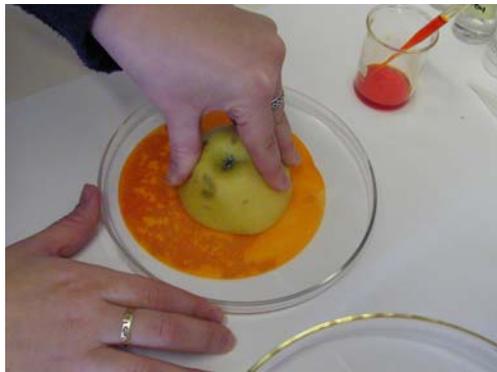


Figura 22: Manzana sobre el papel de filtro



Figura 23: Tinción de las zonas con presencia de Ca^{2+}



Figura 24: Aspecto del papel de filtro una vez seco.

3.9. Determinación de clorofila

3.9.1. Extracción de pigmentos.

El procedimiento de extracción consiste en la homogeneización en mortero de discos de hoja de superficie conocida. Así, para cada muestra, se homogeneizaron 5 discos de 0.33 cm² de superficie cada uno (aproximadamente 7.4 mg/disco) con 10 mL de acetona 100% como agente extractante, en presencia de una pequeña cantidad de ascorbato sódico (punta de espátula pequeña) para prevenir la formación de feofitinas. La suspensión resultante se filtró a través de un sistema Millipore, con un membrana Durapore de 0,22 µm utilizando presión (jeringuilla). Los extractos se guardaron en recipientes de vidrio bien cerrados, forrados con papel aluminio y en frío (a T= -20°C) hasta el momento de su análisis. Para cuantificar los pigmentos se utiliza la técnica de HPLC en fase reversa.

3.9.2. Separación y cuantificación de pigmentos por HPLC

El sistema cromatográfico modular utilizado consta en una bomba *Waters* (Mod. M-51), inyector *Rheodyne 7010* con *loop* de 20 µL, columna de compresión radial C₁₈ (8 x 10 cm) de fase reversa *Nova-Pack* (*Waters*) de 4 µM de diámetro de partícula, un detector visible/ultravioleta *Shimadzu* (SPD-6A V) y un sistema de registro/integración informatizado *PC-Integration Pack ver. 3.00*, *Softron* (*Kontron*). El método utilizado fue el descrito por Val et al. (1994) que consiste en 2 etapas isocráticas en las que las fases móviles son: (i) 1.75% metanol, 1.75% diclorometano y 96.5% acetonitrilo y (ii) 50% acetonitrilo y 50% acetato de etilo, con un flujo de 2 mL·min⁻¹. Los pigmentos fueron detectados a 440 nm. La cuantificación de pigmentos se llevó a cabo según lo descrito por Val et al (1986).

3.9.3. Ecuaciones para la cuantificación de pigmentos

La cuantificación de pigmentos se llevó a cabo según lo descrito por Val et al (1986).

Las longitudes de onda correspondientes a la máxima absorción de clorofilas a y b, en acetona, aparecen a 662 y 645 nm respectivamente. Según Val et al. (1985) las concentraciones obtenida por HPLC se relacionan con los valores de absorbancia a 662 y 645 nm según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = 10.81 \text{ Abs}_{662} - 0.75 \text{ Abs}_{645}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = -3.98 \text{ Abs}_{662} + 19.02 \text{ Abs}_{645}$$

$$\text{Chl t } (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = 6.83 \text{ Abs}_{662} + 18.27 \text{ Abs}_{645}$$

3.9.4. Estimación de clorofila por unidad de área mediante SPAD.

La determinación de clorofila, en campo, se llevó a cabo con un medidor de clorofila portátil (SPAD-502, Minolta Corp). La determinación se realiza sobre un rectángulo de hoja de 2 x 3 mm de área, detectando la luz que emiten dos LED's ($\lambda = 940$ nm, en el infrarrojo y $\lambda = 650$ nm) transmitida a través de la hoja. Esta luz entra en la hoja donde una porción es absorbida por la clorofila y el resto se transmite, siendo detectada por un fotodiodo. La cantidad de luz que alcanza el detector es inversamente proporcional a la cantidad de clorofila en el camino óptico.

La relación entre los valores medidos por el SPAD y la concentración de clorofila no es lineal y los datos obtenidos se pueden ajustar tanto a una ecuación polinómica de segundo grado como a una exponencial. El valor de SPAD se relaciona con la concentración real de clorofila determinada por HPLC o por espectrofotometría, aplicando las ecuaciones de Val et al.,1985 (Apartado3.9.3). En la *Figura 25* se muestran estas calibraciones para el caso del manzano.

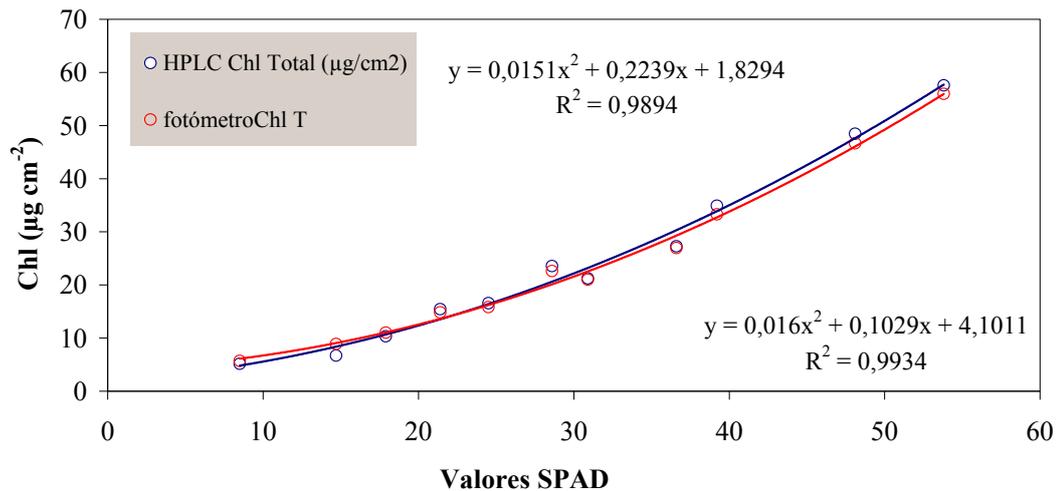


Figura 25: Curvas de calibración del SPAD por HPLC y por espectrofotometría para manzano

En los experimentos de campo, las determinaciones de SPAD se realizaron sobre 20 hojas de cada muestra. En cada hoja se hicieron 2 mediciones, obteniendo la media de la hoja, y al final la del árbol.

3.10. Análisis mineral en hoja y fruto

Se realizaron análisis de los principales nutrientes minerales: macronutrientes (N; Ca, Mg, K y P) y micronutrientes (Fe, Mn, Zn y Cu). Tanto en hoja como en fruto es necesario una preparación previa de la muestra antes de proceder a su análisis (apartado 3.3).

Para determinar calcio, magnesio y potasio, las muestras deben tratarse de manera especial debido a su alto contenido en el tejido foliar. Para ello se toma una alícuota de 1 mL de la dilución de cenizas (apartado 3.5.1) y se lleva a un matraz aforado de 50 mL. Se añade 5 mL de cloruro de lantano al 3%, 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se completa el volumen con agua desionizada.

3.10.1. Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu, por espectrofotometría de absorción atómica

Para determinar los citados elementos se utilizó un aparato de absorción atómica *Unicam mod 929*, excepto para las muestras de 1997 que se leyeron con un *Perkin Elmer*. Las concentraciones de los distintos elementos se determinaron interpolando en las correspondientes rectas de calibrado realizadas con patrones preparados a partir de estándares comerciales (Tritisol, Merck) en el intervalo adecuado para la muestra en cuestión.

Para cada elemento se ajustó la longitud de onda de absorción (Tabla 3) la posición del mechero (alineación y altura), caudales de gases, anchura de rendija, y el resto de parámetros instrumentales.

Tabla 3: Longitudes de onda de los distintos elementos

Elemento	Longitud de onda (nm)
Calcio (Ca)	422,67
Cinc (Zn)	213,86
Cobre (Cu)	324,5
Hierro (Fe)	248,30
Magnesio (Mg)	285,21
Manganeso (Mn)	279,50

3.10.2. K por emisión atómica

Se utilizó el mismo equipo *Unicam mod 929*, en configuración de emisión atómica, es decir, sin lámpara, y con el fotomultiplicador preparado para detectar señales de transmisión. La longitud de onda de emisión del elemento de 766,49 nm y con la llama Acetileno/aire.

3.10.3. Nitrógeno por el método Dumas

La determinación de nitrógeno se realiza por el método de Dumas utilizando un analizador proteico (NA 2100, THERMO)

El NA 2100 es un instrumento dedicado a la determinación cuantitativa de nitrógeno proteico en alimentos, nitrógeno en fertilizantes, suelos y en cualquier matriz que pertenezca al campo agroalimentario.

El fundamento de este método analítico es la combustión instantánea y cuantitativa de la muestra para asegurar una elución efectiva de los gases generados y de su proporción estequiométrica.

La muestra se pesa en una cápsula de zinc que perfectamente cerrada se introduce en el carrusel automático. Se produce la combustión controlada de la muestra a 1800 °C por la inyección de una cantidad fija de oxígeno en una corriente de helio. Los gases de combustión fluyen a través de un sistema que asegura la completa oxidación y después, a través de un agente reductor (cobre) contenido en otro reactor y mantenido a 780 °C, el nitrógeno oxidado se convierte en nitrógeno elemental y se retiene el exceso de oxígeno. De la mezcla gaseosa (N₂, CO₂, H₂O, SO₂) se absorben los dióxidos de carbono y azufre al pasar por un lecho de sosa y la humedad se retiene en un tubo relleno con anhidrona.

El nitrógeno es eluido en una columna cromatográfica (con carbón activo). El gas de combustión purificado cruza un detector de conductividad térmica que envía una señal eléctrica, proporcional a la concentración de nitrógeno, a un sistema de integración basado en PC (Eager 200).

3.10.4. Determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl

Este método se utilizó para analizar el nitrógeno de las muestras tomadas en 1997. Básicamente consiste en la digestión de material molido (0,5 g, obtenido

según el apartado 3.3) con ácido sulfúrico concentrado (20 mL, 98%) y un catalizador (óxido de cobre) durante 2 horas a 150 °C y reflujo. En este paso todo el nitrógeno de la muestra pasa a la forma NH_4^+ . Una vez digerida, la muestra, se deja enfriar y se coloca en un sistema de destilación y se añaden 6-8 gotas de indicador (*fenolftaleína*) y agua destilada hasta un volumen de 100 mL. Estas disoluciones se neutralizan con NaOH (0.1 N), detectándose por el cambio de color a rosa oscuro, con lo que el NH_4^+ pasa a NH_3 . A continuación las muestras se destilan en arrastre de vapor recogiendo el destilado sobre matraces que contienen 15 mL de HCl (0.1 N) y 6-8 gotas de indicador *Shiro-Tashiro* (0,08 g de azul de metileno y 0,125 g de rojo de metilo en 100 mL de etanol de 96°) hasta que el volumen total recogido alcanza 300 mL (8 o 10 minutos de destilación). Una vez realizada la destilación, los matraces conteniendo el destilado se dejan enfriar y el exceso de HCl (0,1 N) se valora con NaOH (0,1 N). El % de N en la muestra puede calcularse con la fórmula:

$$\%N = \frac{0,1 \times (V - V') \times 0,014}{p} \times 100$$

V = volumen de NaOH necesario para neutralizar un blanco (0% de N)

V' = volumen de NaOH consumido por HCl de exceso

p = peso de la muestra

3.10.5. P por colorimetría

La concentración de fósforo en hoja se determina colorimétricamente en la solución obtenida tras la digestión del material vegetal. En presencia de V^{5+} y Mo^{6+} , el fósforo en medio ácido desarrolla un complejo amarillo de vanadofosfomolibdato cuya densidad óptica se mide a 430 nm en espectrofotómetro. La intensidad de la señal a esta longitud de onda es

proporcional a la concentración de elemento presente en la muestra (Martín-Prevel et al., 1987).

3.11. Interpretación del análisis nutricional: Desviación del óptimo nutricional porcentual (DOP)

Para la interpretación de los datos analíticos y realizar el diagnóstico correcto de la situación nutricional en la que se encuentra la plantación, es indispensable disponer de valores de referencia.

Mediante un sencillo método de cálculo pueden determinarse unos índices (índices DOP) que constituyen un adecuado baremo para evaluar, simultáneamente, intensidad y calidad de la nutrición. Este índice de interpretación del análisis vegetal permite además del diagnóstico realista de una situación nutricional dada, conocer el orden de limitación, tanto por exceso como por déficit, de cada uno de los nutrientes considerados.

El índice de Desviación del Óptimo Porcentual (DOP) está definido como la desviación porcentual de la concentración de un elemento con respecto a la concentración óptima considerada valor de referencia (Montañés et al. 1991).

El DOP se calcula aplicando la siguiente relación:

$$DOP = \frac{C * 100}{C_{ref}} - 100$$

Donde, C es la concentración foliar (en porcentaje sobre materia seca) del elemento en la muestra analizada y C_{ref} es el óptimo del mismo elemento (porcentaje sobre materia seca) definido en las mismas condiciones en que fue tomada la muestra y para el mismo cultivo.

El signo del DOP para un determinado elemento, será negativo en caso de déficit y positivo en caso de exceso. Cuando el contenido de la muestra coincida con el óptimo de referencia, el DOP será igual a cero.

Una vez conocido el DOP para cada uno de los nutrientes minerales de interés, puede calcularse el estado en que se encuentra una plantación. Hay que tener en cuenta que el valor numérico absoluto indica la importancia o gravedad de la situación anómala. Lógicamente cuando el índice DOP sea cero el elemento correspondiente se halla en óptima concentración.

Asimismo, la suma de los valores absolutos de los índice DOP (Σ DOP), puede ser utilizada como un indicador del grado de acercamiento de una muestra a la situación nutricional óptima. En efecto, cuanto menor sea el Σ DOP más cerca del óptimo nutricional estará el conjunto de elementos considerados. Por tanto, el Σ DOP puede ser utilizado para ordenar un conjunto de muestras por su grado de alejamiento del óptimo (Σ DOP=0).

3.12. Determinación de iones en fruto por Electroforesis Capilar

El equipo de electroforesis utilizado en este trabajo para la determinación de aniones y cationes fue un “P/ACETM MDQ” de Beckman. Durante los últimos años se ha demostrado que la Electroforesis Capilar (EC) es una técnica de separación adecuada para aniones inorgánicos y orgánicos (Romano et al., 1991, Trenery et al., 1996). La EC presentan ciertas ventajas sobre HPLC y la cromatografía iónica. Las separaciones por EC suelen tener una alta resolución, son rápidas, el tamaño de la muestra es muy pequeño y el coste de consumibles (capilares y electrolito) es bajo. Algunos autores como Putra y Botton (1998) han utilizado diferentes técnicas de separación basadas en EC, para identificar los exudados del xilema en especies de familias como *Rosaceae*, *Juglandaceae* y *Vitaceae*. Estos autores fueron capaces de determinar ácidos orgánicos como el fumárico, tartárico, málico, cítrico, succínico, aspártico, glutámico y fosfato; así como también algunos cationes inorgánicos como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ y NH_4^+ .

3.12.1. Fundamentos de la Electroforesis Capilar

La electroforesis capilar es una técnica basada en la interacción de un campo eléctrico con una partícula cargada.

Las columnas donde se lleva a cabo la separación son capilares de reducido diámetro interno, fabricados en sílice fundida y recubiertos externamente con poliimida con el objeto de facilitar su manipulación. Su longitud oscila en función de la aplicación analítica considerada.

La separación de los analitos mediante electroforesis capilar (EC) se basa en el comportamiento de una muestra, (en medio polar), en el interior de un capilar de vidrio, al aplicar una diferencia de potencial eléctrico. El efecto del campo eléctrico que actúa en el interior del capilar sobre las especies en la disolución (cargadas y neutras), se traduce en el desplazamiento de éstas por el interior de la columna hacia el electrodo correspondiente, a una velocidad determinada por la movilidad total de cada una de ellas.

La velocidad (v) que adquiere toda partícula cargada contenida en el capilar, cuando se aplica al mismo una diferencia de potencial, depende de su movilidad iónica total " μ " y de la intensidad del campo eléctrico en el interior de la columna " E ", es decir, $v = \mu E$

La intensidad del campo eléctrico en el interior del capilar depende del voltaje aplicado (V) y de la longitud (L) $E = V L^{-1}$.

Combinando ambas ecuaciones se obtiene que la velocidad de cada analito es función de tres parámetros: movilidad iónica, voltaje aplicado y longitud del capilar.

Se deduce que para cada grupo de analitos sometidos a las mismas condiciones de trabajo, el voltaje y la longitud de la columna serán iguales, por lo que la velocidad será específica, y por lo tanto será posible realizar una separación

con un grado de selectividad que dependerá de la diferencia relativa entre los valores de la movilidad iónica total.

La movilidad iónica total es la resultante de dos contribuciones independientes: movilidad electroforética ($[u_m]$) y movilidad electrosmótica ($[u_o]$).

La *movilidad electroforética* es la debida a la interacción del campo eléctrico con una partícula cargada, bien positivamente, moviéndose hacia el ánodo (+), o bien negativamente, moviéndose hacia el cátodo (-). Las partículas con más carga tendrán mayor movilidad y a igualdad de cargas será más rápida la de menor tamaño molecular.

La *movilidad electrosmótica* es consecuencia de una interacción entre las cargas positivas de la disolución que se desplaza por el capilar y la distribución de cargas negativas en él, que son el resultado del contacto de la disolución utilizada como electrolito con la pared del capilar.

Cuando se establece una diferencia de potencial eléctrico entre los extremos del capilar, las cargas positivas que están interaccionando con la pared son atraídas hacia el cátodo (junto a sus esferas de hidratación). Debido al pequeño diámetro de la columna, el volumen total de disolución implicado en el desplazamiento representa el total del contenido, creándose un flujo interno, que arrastra a toda la disolución contenida en la columna hacia el cátodo. Este fenómeno se conoce como *Flujo electrosmótico* (EOF).

Para que los análisis sean reproducibles, antes de cada sesión analítica es preciso realizar un acondicionamiento del capilar. El flujo electrosmótico se origina, según se ha dicho antes, como consecuencia de la ionización de los grupos silanol de la superficie interna del capilar. Para que esta situación sea reproducible se debe purgar el capilar con una disolución alcalina (NaOH 0,1 N). El medio básico favorece la ionización total de los grupos silanol de la pared del capilar, lo que contribuye a que se alcance en la columna, al comienzo de cada

sesión, unas condiciones muy similares. Tras el paso de la disolución básica, se realiza otra purga pero esta vez con el electrolito de trabajo para asegurar su llenado y estabilización.

La finalidad del electrolito de trabajo es conseguir que el medio posea la conductividad necesaria para la realización del recorrido electroforético. Además cuando los compuestos a determinar sean transparentes, se elige como electrolito un compuesto que aporte una absorción intensa y constante, realizándose la lectura por absorbancia indirecta.

La inyección de la muestra en el capilar se realiza por el extremo opuesto al detector, por medio de presión en el extremo de entrada del capilar, aplicando vacío en el extremo de salida del capilar o aplicando voltaje. La aplicación de voltaje durante la separación hace que los componentes de la muestra migren por el capilar a distintas velocidades.

3.12.2. Método de análisis para especies catiónicas

El sentido del movimiento para cada especie viene dado por la movilidad electroforética y la movilidad electrosmótica. Los cationes serán desplazados por el EOF hacia el cátodo, ya que la inyección se lleva a cabo en el ánodo.

Se puso a punto un método capaz de detectar y cuantificar las especies catiónicas de interés para este trabajo, K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} .

- *Electrolito de trabajo*

Se prepararon soluciones madre 20 mM de 4-Aminopiridina a pH=7.3 ajustado con fosfato al 5% y 20 mM de éter 18-Crown-6 a partir del sólido. El electrolito de trabajo consistió en una mezcla de ambas en una proporción 1:4.

- *Condiciones de análisis*

Una vez preparados los correspondientes tampones y acondicionado el capilar se programó el sistema para llevar a cabo la separación y posterior registro de la señal con las siguientes condiciones: longitud de onda = 214 nm; voltaje aplicado = +30 kV; temperatura = 20°C tiempo de inyección = 4 segundos a una presión de 50.0 mBar y polaridad normal. La separación de los tres cationes se obtuvo en 4 minutos.

3.12.3. Método de análisis para especies aniónicas

Para determinar especies aniónicas se debe invertir la polaridad del sistema (inyección en el cátodo y detección en el ánodo) pero con esta configuración al detector sólo llegarían determinados aniones que además estarían retrasados por el efecto del EOF que mantiene su movimiento hacia el cátodo arrastrando a los aniones y cationes que encuentra a su paso. Por lo tanto habrá que detener o invertir este EOF. Esto se consigue añadiendo al electrolito de trabajo un agente de surfactante catiónico a alta concentración, de manera que se forma una doble capa sobre la superficie del capilar. Así, la disposición de las cargas sobre la pared del capilar es positiva y serán las cargas negativas de la disolución las que interaccionen con ella para generar el EOF, que tras la aplicación de la diferencia de potencial se dirigirá hacia el ánodo, y por lo tanto todos los aniones llegarán al detector.

Las especies aniónicas a determinar fueron las que mayoritariamente se encuentran en las manzanas: fosfato y algunos ácidos orgánicos como el ácido málico, ácido cítrico, ácido quínico y ácido láctico

- *Electrolito de trabajo*

Se prepararon soluciones madre de 20 mM PDCA (ácido 2,6-piridin dicarboxílico) y de 5 mM de CTAB (N, cetil-N, N,N-trimetilamonio bromuro) este último como modificador del flujo electrosmótico. A partir de estas

soluciones se preparó diariamente el electrolito de trabajo diluyendo en una relación 1:2,5 y ajustando el pH a 3,17 con NaOH.

- *Condiciones de análisis.*

Una vez preparados los correspondientes tampones y acondicionado el capilar se programó el sistema para llevar a cabo la separación y posterior registro de la señal con las siguientes condiciones: longitud de onda = 214 nm; voltaje aplicado = -25 kV; temperatura = 20°C tiempo de inyección 5 sg a 50 mBar de presión y polaridad inversa.

3.13. Análisis de datos

Los datos tomados se analizan estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y cuando el resultado mostró diferencias significativas, se realizó un test Duncan de separación de medias. En algunos casos se realizaron análisis de regresión para establecer posibles relaciones entre distintos parámetros.

4. Resultados y Discusión

4.1. Parámetros de cosecha, morfológicos y de calidad de las manzanas Golden de Quinto de Ebro

El objetivo último del fruticultor es obtener la mayor producción posible de fruta de gran calidad, con el mínimo coste y evitando, en lo posible, la degradación del entorno.

En ninguno de los tres años de este estudio se encontraron diferencias significativas en los parámetros de producción que pudieran atribuirse a los tratamientos aplicados en la plantación (resultados no mostrados). En el apartado 3.2.2 se describen el detalle de estos tratamientos. Así, ni los distintos niveles de aclareo aplicados durante 1997, 1998 y 1999; ni la aspersión con compuestos de calcio en 1997, ni, finalmente, la aplicación de un regulador de crecimiento (Prohexadione Ca), afectaron a los parámetros expuestos en la *Tabla 4*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Esto nos ha permitido tratar estadísticamente los resultados obtenidos en un mismo año, en la misma plantación sin considerar otros factores de variación.

En la *Tabla 4*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** puede apreciarse que el año 1998 fue el menos productivo de los tres considerados. El índice de cosecha en Kg árbol⁻¹ toma un valor de 36,2 frente los 59 y 67 de 1997 y 1999 respectivamente. Esto podría atribuirse a que en este año se seleccionaron ejemplares con un promedio de sección de tronco (≈ 56 cm²) inferior al de los otros dos (≈ 62 cm²). Sin embargo, la carga de cosecha en frutos por árbol resultó similar el primero y segundo años debido a que los aclareos aplicados dejaron en la planta un número de frutos en consonancia con el tamaño de planta. En 1999 la carga de cosecha soportada por los árboles fue un 20-25% mayor que en los otros dos años. Esto indujo un aumento en el n° de frutos por árbol, un descenso en el tamaño y peso de los frutos y, consecuentemente, mayor productividad y producción total.

Tabla 4: Indicadores de producción y productividad en manzanos de la variedad Golden Smoothie (densidad de plantación 1250 árboles x ha⁻¹) en los tres años de experimentación.

	1997	1998	1999
Producción (kg/árbol)	59,155	36,2	66,58
N° frutos árbol⁻¹	283,6	241,7	396,5
Peso fruto (g)	210,98	167,7	167,93
Sección de tronco (cm²)	62,1	55,8	61,6
Superficie fructificante máx. (cm² ha⁻¹)	77607	69720	76991
Productividad: gramos de fruto x cm⁻² de tronco	480,6	369,9	542,65
Carga de cosecha (N° frutos cm⁻²)	2,3	2,5	3,3
Producción total (Tm ha⁻¹)	74	45	83

La producción por hectárea es un estimador de la eficacia de la superficie fructífera y de la tierra ocupada. Según Westwood (1982), la superficie fructífera

potencial máxima para manzanos ‘Golden Delicious’, expresada como el sumatorio de las secciones transversales de tronco por hectárea, es de 95.000 cm² o 56.000 cm² si el patrón es enanizante. La plantación objeto de estudio está injertada sobre M9, patrón que reduce considerablemente el crecimiento vegetativo del cultivar. Así, con un valor de la superficie fructificante máxima de 7-7,7 m² ha⁻¹, se han obtenido valores de producción de 45 a 83 Tm ha⁻¹, que pueden considerarse excelentes, teniendo en cuenta que el rendimiento medio del manzano, en las parcelas de regadío de la provincia de Zaragoza es de 23,6 Tm ha⁻¹ (Anuario Estadístico Agrario de Aragón, 2001).

4.1.1. Análisis de crecimiento de fruto

En el período del cuajado de frutos, que se produce tras la polinización y la fecundación, el fruto es todavía muy pequeño y su futuro tamaño susceptible de ser modificado por factores que pueden afectar a su velocidad de crecimiento. El estudio de estos procesos es importante para comprender los posibles efectos de la aplicación de técnicas como la fertilización, poda, reguladores de crecimiento y aclareo de frutos.

Para el manzano, el periodo de máxima tasa de división celular se produce a las 4-5 semanas tras la antesis. Los espacios de aire intercelulares están ausentes o son muy pequeños en el momento de la floración y aumentan al mismo ritmo del crecimiento celular, permaneciendo relativamente constantes durante el resto de la estación. Las vacuolas se forman al principio de la fase de crecimiento de las células y aumentan de tamaño conforme crecen éstas, terminando por ocupar la mayoría del citoplasma (Westwood, 1982). El sumatorio de contribuciones integrado por la división celular, el crecimiento del tamaño de células, y la formación de los espacios de aire da lugar, en el caso de las manzanas a una curva sigmoideal (en forma de S) cuando se representa el volumen o peso del fruto en función del tiempo.

Al igual que en el apartado anterior, los tratamientos aplicados durante los tres años no produjeron diferencias significativas respecto al tamaño del fruto ni a su velocidad de crecimiento. Por lo tanto, para realizar los análisis estadísticos, se ha considerado el conjunto de datos obtenidos a lo largo de cada temporada, sin tener en cuenta los factores de los distintos diseños experimentales.

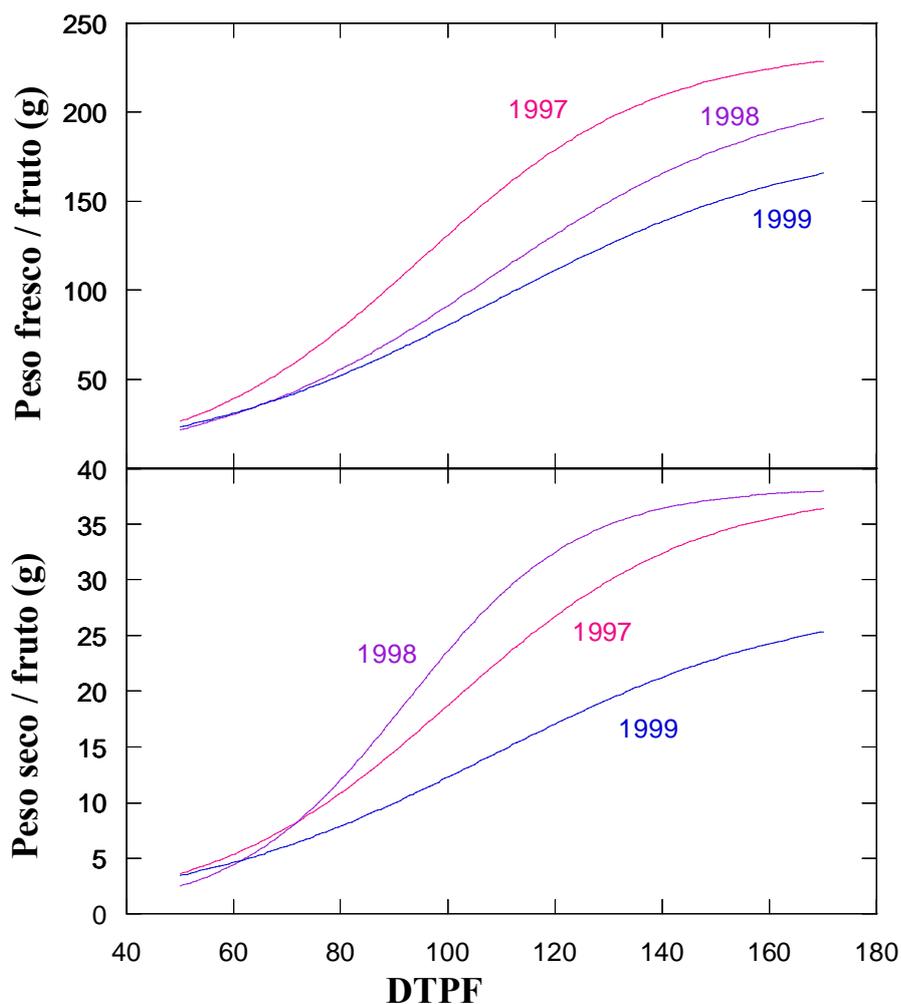


Figura 26: Curvas de crecimiento del peso fresco y seco del fruto

En la *Figura 26*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra la evolución del peso del fruto (fresco y seco) a lo largo de su periodo de desarrollo, durante los tres años estudiados. Dicha evolución se ajusta, a ecuaciones logísticas de crecimiento que, cómo se ha mencionado anteriormente, en el caso de las manzanas y otros frutos de pepita se trata de sigmoideas simples. Estas ecuaciones se han obtenido, utilizando el método descrito en el apartado 3.6.2, a partir de los valores medios de peso, en cada fecha de muestreo, mediante el ajuste a las respectivas ecuaciones de regresión no lineal para un alfa de 0,05.

Tabla 5: Ecuaciones logísticas de crecimiento

Peso fresco

1997	$Y = \frac{235.919}{1 + e^{-0.046*(x-95.09)}}$	$R^2 = 0.9089$
------	--	----------------

1998	$Y = \frac{215.799}{1 + e^{-0.037*(x-108.191)}}$	$R^2 = 0.9326$
------	--	----------------

1999	$Y = \frac{187.163}{1 + e^{-0.033*(x-108.459)}}$	$R^2 = 0.8805$
------	--	----------------

Peso seco

1997	$Y = \frac{38.091}{1 + e^{-0.044*(x-100.682)}}$	$R^2 = 0.9050$
------	---	----------------

1998	$Y = \frac{38.265}{1 + e^{-0.063*(x-92.348)}}$	$R^2 = 0.9084$
------	--	----------------

1999	$Y = \frac{28.4342}{1 + e^{-0.034*(x-107.995)}}$	$R^2 = 0.8543$
------	--	----------------

En la *Tabla 5* se detallan las ecuaciones obtenidas con sus correspondientes coeficientes de determinación. En todos los casos, el estadístico R^2 indica que el modelo es capaz de explicar, en el peor de los casos, el 85% de la variabilidad de los pesos seco y fresco. Esta bondad en el ajuste permite comparar, con fiabilidad la evolución de los frutos, a partir de los parámetros calculados de las curvas de crecimiento expuestas en la *Figura 26*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Así mismo, se presentan los parámetros de crecimiento que han sido obtenidos siguiendo el procedimiento descrito por Costa et al. (1995), tal y como se recoge en el mencionado apartado de Material y Métodos. A partir de las ecuaciones de las curvas de crecimiento, se pueden calcular el valor del máximo crecimiento posible que sería la asíntota de la curva en el eje de abscisas, el tiempo de máximo crecimiento y la velocidad máxima de crecimiento. Como puede observarse, en 1997, se alcanza el valor teórico más alto de peso fresco máximo. Sin embargo, el peso seco máximo, según la asíntota de la curva correspondiente, se alcanzaría en 1998.

Tabla 6: Valor máximo de crecimiento, tiempo de máximo crecimiento y tasa de máximo crecimiento para el peso fresco y seco del fruto

	1997	1998	1999
Peso fresco			
Peso fresco máximo (g)	235,919	215,799	187,163
Tiempo máximo crecimiento (DTPF)	95,90	108,191	108,459
Tasa máximo crecimiento (g día⁻¹)	2,710	1,996	1,544
Peso seco			
Peso seco máximo (g)	38,09	38,26	28,43

Tiempo máximo crecimiento (DTPF)	100, 68	92,3 5	107, 99
Tasa máximo crecimiento (g día⁻¹)	0,42	0,60	0,24

Es interesante comprobar cómo durante 1999, año que según la *Tabla 4*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, los árboles soportaron la carga de cosecha más alta, y, por tanto, mayor número de frutos, el peso máximo teórico desciende dramáticamente, ya que la pendiente máxima de estas curvas es la menor (*Figura 26*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y *Tabla 6*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

4.1.2. Sólidos solubles

En el proceso de maduración los frutos del manzano convierten el almidón en azúcares, primero en sacarosa y luego en glucosa y fructosa. Como la sacarosa es el principal componente de los sólidos solubles de las manzanas, la medida de éstos con un refractómetro da el valor de los azúcares disueltos en el jugo del fruto. Este parámetro es el más importante indicador de la calidad del fruto, ya que, junto a la acidez, condicionan el sabor del mismo (Carrera, 1999).

El grado de madurez de la fruta al momento de la cosecha, es un factor de primera importancia, debido a que de él depende principalmente la palatabilidad y aceptación del producto por el consumidor, además de su capacidad de almacenamiento.

Cuando la fruta se cosecha inmadura, aunque reciba los más adecuados manejos postcosecha, la calidad comestible y de presentación será inferior que la que se cosecha con la madurez óptima y es, además, muy susceptible a desordenes fisiológicos como bitter pit y escaldado, que disminuyen considerablemente el periodo de almacenamiento y la aptitud comercial debido a que son frutos con escaso desarrollo de color, ácidos, más duros y más propensos a deshidrataciones

en el almacenamiento. También una cosecha prematura implica pérdidas de producción puesto que se obtienen menores tamaños. Por otra parte, la fruta que se cosecha muy madura no resiste un almacenamiento prolongado, debido a la rápida pérdida de consistencia de la pulpa y de sus cualidades organolépticas, así como a su mayor predisposición a ciertas alteraciones fisiológicas como pardeamiento interno, escaldado senescente y corazón acuoso; también se hace más susceptible al ataque de microorganismos patógenos causantes de las podredumbres.

Durante los tres años del estudio el contenido en sólidos solubles aumenta conforme el fruto se va desarrollando, al principio de forma lenta y más rápidamente cuando se acerca la fecha de recolección (*Figura 27; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Los valores obtenidos en cosecha, se encuentra en el rango de los recomendados para las manzanas del grupo Golden (Carrera, 1999). Asimismo, se observa cómo en 1998 el contenido de sólidos solubles fue el más alto de los tres años estudiados.

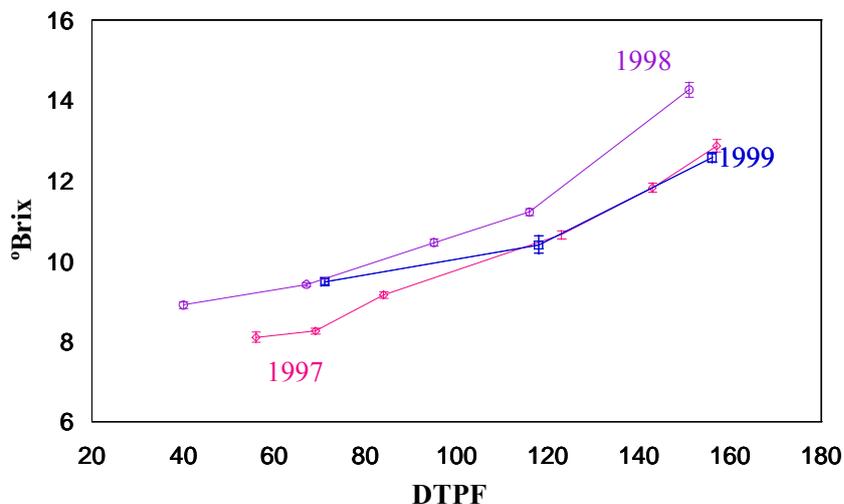


Figura 27: Evolución de azúcares (°Brix) en fruto durante los 3 años del estudio

4.1.3. Relación entre sólidos solubles y SPAD

En la *Figura 28*; *Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se demuestra la existencia de relación entre carbohidratos solubles y clorofila foliar. Se obtuvo un ajuste lineal para los tres años significativo a un nivel de confianza del 99% para 1997 y 1998 y del 95% para el último año.

Un incremento en la concentración de clorofila foliar se traduce en un aumento del contenido de carbohidratos solubles con excelentes coeficientes de correlación (0,997; 0,988 y 0,998 para 1997, 1998 y 1999 respectivamente). Esto podría ser reflejo de la actividad fotosintética de las hojas, ya que, según se ha comprobado (Val et al., 2000), conforme avanza la estación desciende la concentración de N foliar, pero aumenta la concentración de clorofila, lo que finalmente se traduce en un aumento del transporte de fotoasimilados al fruto.

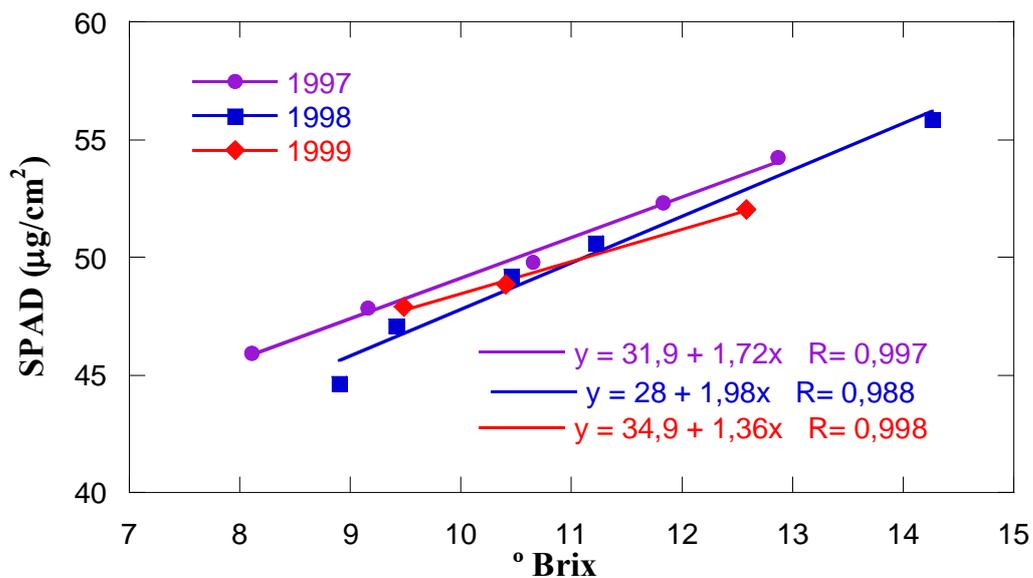


Figura 28: Relación entre clorofila foliar y sólidos solubles en fruto

Al comparar estadísticamente las rectas obtenidas en los tres años, se comprueba que no existen diferencias significativas entre ellas, ni en la pendiente ni en la ordenada en el origen para un nivel de confianza del 90%. Por lo tanto, es posible ajustar los datos a una sola ecuación que englobe los tres años (*Figura 29; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Según dicha figura, teóricamente, realizando cuantificaciones de clorofila foliar podría predecirse la concentración de carbohidratos solubles en la manzana, parámetro especialmente útil como indicador de calidad y del estado de madurez de la fruta.

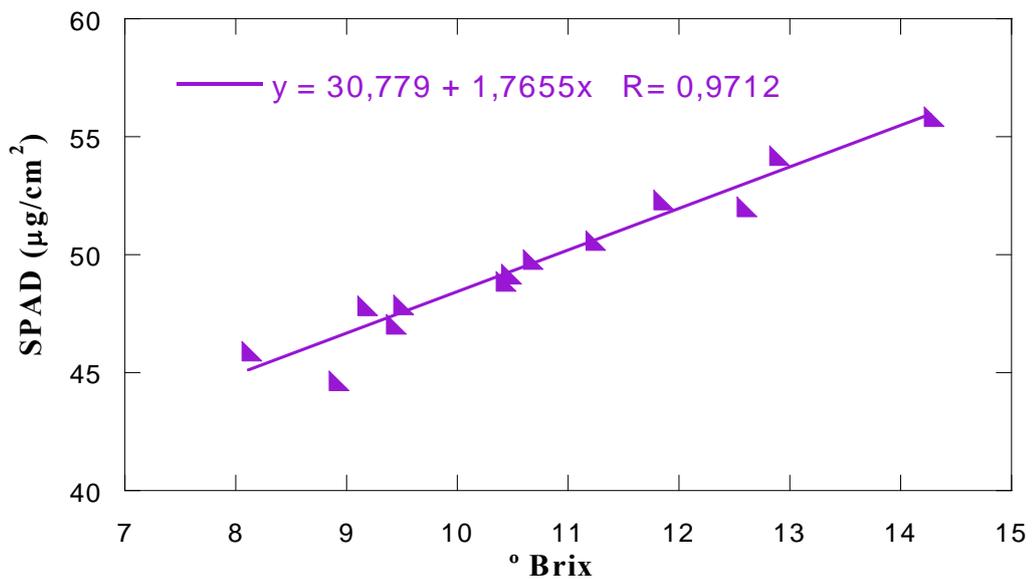


Figura 29: Ajuste a una sola recta la relación de los 3 años entre clorofila y azúcares.

4.2. Estatus nutricional de la plantación

El contenido de un tejido vegetal en elementos minerales esenciales, si es debidamente interpretado, proporciona un indicador muy útil, ya que el comportamiento de la planta viene determinado por la cantidad de cada elemento presente en ella. Para obtener un rendimiento máximo, cada uno de ellos debe estar presente en equilibrio y en cantidad apropiados, para lo cual los niveles determinados por análisis deben estar comprendidos dentro de unos límites de concentración específicos. Por debajo de esos límites hay deficiencia y por encima, exceso, incluso toxicidad del elemento en cuestión.

Las plantaciones frutales tienen una dinámica de nutrientes que difiere en gran medida de la de los cultivos herbáceos (Sió y Boixadera, 1995). En primer lugar, se trata de un cultivo perenne, que ocupará el terreno durante un largo período de tiempo. En segundo lugar, se debe considerar que el objetivo prioritario de una plantación frutal no es la creación de biomasa, sino que, como indica Atkinson (1986), la calidad y la aptitud para la conservación frigorífica de los frutos deben ser factores claves en la nutrición de los frutales.

La interpretación de los datos analíticos y el diagnóstico correcto de la situación nutricional en la que se encuentra una plantación, requiere disponer de unos valores de referencia óptimos, para conocer la situación nutricional real y el orden de limitación de cada uno de los nutrientes considerados.

En un reciente trabajo de revisión Lucena (1997), expone los distintos métodos de interpretación del análisis nutricional de plantas. Alguno de estos métodos tiene en cuenta las interacciones entre nutrientes como, el DRIS (Diagnostic and Recommendation Integrated System); algunas variaciones de éste como el M-DRIS consideran la materia seca (M) como otro componente a utilizar en las relaciones nutricionales y en el Log-DRIS se usan diferentes ecuaciones para eliminar el efecto de la curtosis en el coeficiente de variación cuando se

utiliza el tradicional DRIS. También es muy utilizado el CND (Compositional Nutrient Diagnosis); y por último el DOP (Desviación del Óptimo Porcentual) que es el que se ha utilizado en este trabajo aplicando los datos de los análisis nutricionales de hojas y frutos. El sistema DOP (Montañés *et al.*, 1991), por una vía de cálculo mucho más sencilla, puede llegar a las mismas conclusiones interpretativas que el DRIS en lo que respecta a fijar el mismo orden de limitación de nutrientes aun cuando no sea este su objetivo, pero al ser sus índices numéricos indicadores de situaciones de déficit o exceso (signo - ó +) y su valor absoluto cuantificador del posible desarreglo nutricional, permite la emisión de un diagnóstico bajo los aspectos cuantitativos y cualitativos de la nutrición (Sanz, 2000).

4.2.1. Diagnóstico nutricional a partir del análisis de hoja.

El análisis foliar proporciona información sobre las necesidades nutricionales de los cultivos. A través del análisis de suelo, únicamente se dispone de información acerca de la disponibilidad de nutrientes, en cambio, el análisis de las hojas informa de los nutrientes absorbidos por el árbol y, además, pueden ponerse de manifiesto situaciones de deficiencia o exceso en alguno de estos nutrientes, aun cuando todavía no se hayan desarrollado síntomas visuales. Los análisis de suelo, son valiosos para estimar la disponibilidad de nutrientes y la acidez o salinidad. No obstante, puesto que las hojas son importantes centros de síntesis, los análisis foliares reflejan el estado nutritivo de la planta con más fidelidad que los del suelo.

Se han estudiado los índices DOP en hojas para conocer la situación nutricional del cultivo y el orden de limitación, tanto por exceso como por defecto, de los nutrientes considerados. Para determinar estos índices se aplicó la ecuación descrita por Montañés *et al.* (1991), como se detalla en el apartado 3.11,

tomando como valores de referencia para hoja los recopilados por Gagnard (1987) en la *Tabla 7*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Tabla 7: Valores de referencia óptimos en hoja de manzano. Los datos mostrados son el promedio de los recopilados por Gagnard (1987).

Macronutrientes	N	P	K	Ca	Mg
(% ms)	2,43	0,20	1,46	1,46	0,30
Micronutrientes	Fe	Mn	Cu	Zn	
(mg kg⁻¹ ms)	173,33	76,67	11,21	38,86	

En la *Tabla 8*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran las medias de los resultados obtenidos en los análisis nutricionales de las hojas muestreadas entre 75 y 105 DTPF, tiempo óptimo de muestreo según las recomendaciones de Gagnard (1987), en los tres años consecutivos estudiados.

Tabla 8: Nutrientes en hoja de manzano a 75-105 DTPF, en los tres años estudiados

Macronutrientes	N	P	K	Ca	Mg
(% ms)					
1997	2,83	0,18	1,75	0,92	0,36
1998	2,64	0,17	1,69	1,21	0,40
1999	2,58	0,22	1,84	0,97	0,38
Micronutrientes	Fe	Mn	Cu	Zn	
(mg kg⁻¹ ms)					
1997	103,70	25,75	9,95	19,10	
1998	113,00	36,37	13,92	16,74	
1999	97,27	24,48	21,70	14,57	

Para facilitar el estudio de los resultados obtenidos, en la *Tabla 9; Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se representan los índices DOP separando los macro de los micronutrientes.

En los 3 años, la deficiencia de Ca^{2+} en hoja es, cuantitativamente, uno de los factores importantes que definen las características de esta plantación. A esto hay que unir el exceso de Mg^{2+} y K^+ , que también se repite durante los tres años. Excepto en el caso del Cu, todos los micronutrientes están en menor concentración que los descritos en las referencias; cinc y manganeso son los elementos más deficitarios seguidos del hierro. Sin embargo, en ninguno de los tres años se observaron síntomas visuales de la carencia de alguno de estos microelementos. Es probable que la plantación sufra endémicamente de deficiencias subclínicas, como indican los índices DOP de cada nutriente y el indicador de la nutrición global (ΣDOP) de la *Tabla 9; Error! No se encuentra el origen de la referencia..*

Tabla 9: Índices DOP de los elementos analizados en hojas

Año	Ecuaciones	Σ DOP
1997	Macronutrientes 20,33 Mg > 19,66 K > 16,30 N > -10,50 P > -36,99 Ca	103,78
	Micronutrientes -11,24 Cu > -40,17 Fe > -50,85 Zn > -66,41 Mn	168,67
1998	Macronutrientes 33,33 Mg > 15,75 K > 8,64 N > -15,00 P > -17,12 Ca	89,84
	Micronutrientes 24,17 Cu > -34,81 Fe > -52,56 Mn > -56,92 Zn	168,46
1999	Macronutrientes 25,75 K > 25,67 Mg > 11,50 P > 6,21 N > -33,49 Ca	102,62
	Micronutrientes 93,61 Cu > -43,88 Fe > - 62,50 Zn > -68,07 Mn	268,06

4.2.2. Diagnóstico nutricional a partir del análisis de fruto

Al igual que se hizo con los análisis de hojas, se determinaron los índices DOP en los frutos para conocer el estado nutricional de los mismos. Apenas se encuentran referencias de valores óptimos de nutrientes en manzanas, ya que

normalmente el diagnóstico nutricional se realiza a partir de los análisis foliares. Para solventar esta dificultad, procedimos a realizar análisis de manzanas de calidad certificada y prolongada capacidad de conservación. Estas manzanas fueron adquiridas en un reputado comercio, y las que no se utilizaron en el análisis se almacenaron, para comprobar la aparición de daños durante el almacenamiento. En todos los casos la fruta se conservó sin alteración apreciable, incluyendo aparición de fisiopatías durante 3 meses a partir de la fecha de compra. Los resultados de los análisis se muestran en la *Tabla 10*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** El cálculo de los índices DOP se realizó, como en el caso de las hojas.

Tabla 10: Análisis de 9 variedades de manzana de alta calidad y excelente capacidad de conservación. Los datos son el promedio de 5 réplicas y los resultados se expresan, sobre la base de materia seca, en g 100g⁻¹ para macromelementos y mg kg⁻¹ para microelementos.

Variedad	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn	K/Ca
Royal Gala	0,28	0,078	0,719	0,106	0,049	17,54	6,45	7,04	3,07	6,78
Golden-delicious	0,364	0,067	0,877	0,062	0,035	18,18	3,53	5,32	2,38	14,26
Red Delicious	0,252	0,063	0,603	0,074	0,038	20,45	3,19	6,55	1,97	8,20
V. Doncella	0,504	0,099	1,094	0,082	0,050	16,76	2,52	6,39	1,07	13,42
Gloster	0,308	0,064	0,617	0,086	0,037	19,18	4,31	5,46	1,50	7,17
Reineta Parda	0,532	0,085	0,936	0,114	0,040	25,43	4,15	8,52	1,72	8,25
Fuji	0,252	0,055	0,497	0,115	0,021	14,67	4,74	6,85	2,44	4,32
Granny Smith	0,308	0,047	0,696	0,124	0,028	25,77	5,44	5,68	2,06	5,63
Reineta Blanca	0,364	0,058	0,927	0,15	0,035	31,09	3,10	7,02	2,28	6,20
Promedio	0.350	0.067	0.770	0.100	0.035	21.010	4.160	6.530	2.050	0.350

Los resultados obtenidos en la *Tabla 10*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, discrepan, en cierta forma con los propuestos por Waller (1980), y que luego han sido utilizados por un gran número de autores. Estos

valores, una vez transformados a porcentaje de peso seco, son los siguientes: N = 0,38; P = 0,07; K = 0,85, Ca = 0,03 y Mg = 0,03. Como puede observarse, la principal discrepancia aparece en el caso del Ca²⁺, si bien este autor apunta que estos valores de calcio deben ser los mínimos para destinar las manzanas a un almacenamiento prolongado. En nuestro caso el menor valor se encontró en Golden delicious (0,067 % ms) y el más alto en la Reineta Blanca del Canadá (0,15 % ms).

En la *Tabla 11*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los resultados obtenidos de los análisis realizados a los frutos en el momento de la recolección en los tres años consecutivos estudiados.

Tabla 11: Valores obtenidos en cosecha del análisis de frutos estudiados

Macronutrientes (% ms)	N	P	K	Ca	Mg
1997	0,51	0,17	0,83	0,01	0,04
1998	0,39	0,06	0,75	0,03	0,04
1999	0,32	0,07	0,83	0,05	0,04
Micronutrientes (mg kg⁻¹ ms)	Fe	Mn	Cu	Zn	
1997	18,05	2,80	4,55	3,35	
1998	24,30	1,90	4,56	1,60	
1999	44,29	1,20	5,28	1,97	

Durante los tres años del estudio las concentraciones de Ca²⁺ se situaron muy por debajo del valor de referencia como lo indican los respectivos valores de índice DOP. El sumatorio de valores absolutos de índices DOP indica que en 1997

los frutos de la plantación sufrían un marcado desequilibrio nutricional, que se ha ido aliviando con el transcurso de los años. Así, mientras en el primer año, además de la deficiencia de Ca^{2+} se encontraban excesos de fósforo, nitrógeno y magnesio, en los siguientes años disminuyeron estos niveles hasta prácticamente igualarse con las concentraciones consideradas óptimas. Sin embargo, al contrario que los macronutrientes, el desequilibrio entre oligoelementos aumenta con el transcurso del tiempo, la deficiencia de Mn^{2+} en fruto aumenta de año en año, concomitantemente con la concentración de Fe que alcanza los niveles más altos en 1999. El comportamiento del Zn es contrario al del Fe, con un nivel excesivo en 1997 para llegar a ser deficitario en 1999.

A continuación se detallan los resultados obtenidos al aplicar las ecuaciones de cálculo del índice DOP.

Tabla 12: Índices DOP de los macronutrientes analizados en fruto a partir de las referencias obtenidos de manzanas comerciales en perfecto estado de conservación

Año		Ecuaciones	Σ DOP
1997	Macronutrientes	146,27 P > 45,71 N > 22,86 Mg > 7,79 K > -86,00 Ca	308,63
	Micronutrientes	63,41 Zn > -14,02 Fe > -30,32 Cu > -32,69 Mn	99,28
1998	Macronutrientes	12,90 N > 11,43 Mg > -10,90 P > -3,12 K > -67,00 Ca	105,35
	Micronutrientes	15,65 Fe > -22,05 Zn > -30,14 Cu > -54,35 Mn	124,85
1999	Macronutrientes	20,00 Mg > 1,49 P > 8,05 K > -9,84 N > -54,00 Ca	93,38
	Micronutrientes	110,81 Fe > -4,00 Zn > -19,10 Cu > -71,27 Mn	205,18

4.3. **Evolución de nutrientes en 3 ciclos de cultivo**

Se estudió la concentración de elementos minerales (macro y micronutrientes), tanto en hoja como en fruto, durante el periodo de desarrollo para conocer la evolución de nutrientes en los árboles de la plantación en los tres años del estudio.

4.3.1. **Elementos minerales en hoja**

4.3.1.1. **Macronutrientes**

En la *Figura 30*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se representa la evolución de los macronutrientes analizados en hoja de manzano en tres años consecutivos. En general, el contenido de la mayoría de los macronutrientes disminuye a lo largo del desarrollo del fruto, excepto el magnesio que en 1997 y 1998 aumenta.

Durante el crecimiento, las plantas requieren la incorporación de minerales como paso previo al crecimiento de la biomasa. Por lo tanto, los nutrientes más importantes deben encontrarse a disposición del vegetal. Es por ello comprensible que un suministro insuficiente de minerales desde el principio del crecimiento mantenga bajo el incremento de la materia orgánica. Así, las hojas en desarrollo de los árboles se enriquecen previsoramente de los principales nutrientes como N, P, K (Gil, 1995).

En efecto, como se observa en la mencionada figura, la concentración de nitrógeno en hoja disminuye a lo largo de la estación. El valor más alto corresponde al primer punto de muestreo, lo que hace suponer que al comienzo de la estación las hojas contienen mayor concentración de este elemento que en las etapas sucesivas. Este comportamiento se ajusta al descrito por Sió (1995) para hojas de Golden Delicious y por Westwood (1982) para 'Delicious' y también de melocotonero: los máximos porcentajes de N y P en las hojas de ambos frutales se

producen al comienzo de la estación, se estabilizan relativamente durante la parte media de la misma y descienden rápidamente en la etapa final.

En el año 1999 los niveles de nitrógeno fueron menores que en los dos anteriores. Sin embargo, en todas las muestras, la concentración foliar fue superior al 2% de peso seco, nivel considerado como normal por Westwood (1982), entre otros autores.

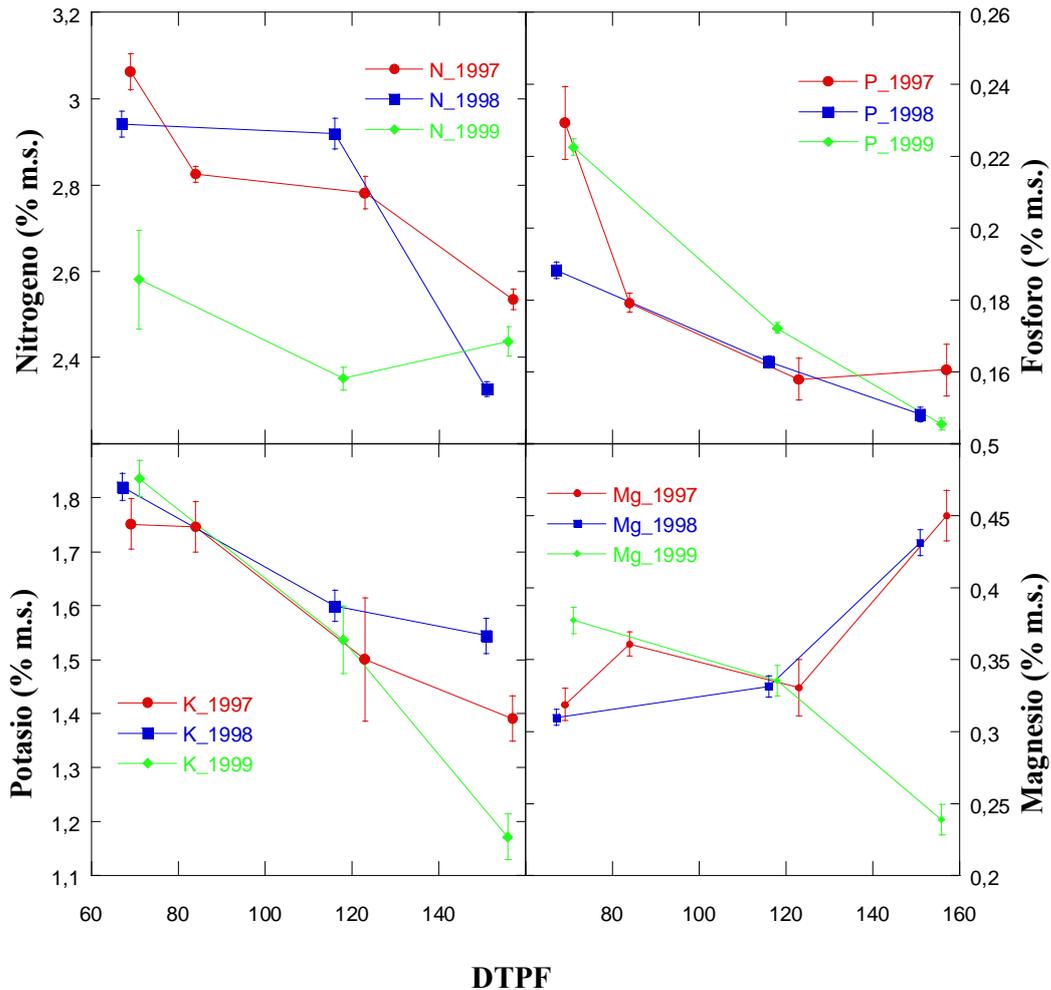


Figura 30: Evolución de la concentración foliar de macronutrientes durante los tres años del experimento (% de materia seca)

En general, la nutrición nitrogenada tiene una especial influencia en el tamaño y composición de los frutos. Los frutos son potentes sumideros de los fotosintatos que producen las hojas, órganos en los que el contenido en nitrógeno constituye uno de los principales factores que determina la tasa de fotosíntesis por unidad de área (Faust, 1989).

Como se observa en la misma figura, al igual que el nitrógeno, el contenido de fósforo en hoja descende a lo largo de la estación, tendencia que está de acuerdo con la descrita por Sió (1995) y Nurzynski et al., (1990). Las concentraciones encontradas en el periodo estándar de muestreo son inferiores, en los tres años, a 0,18% ms). Según Gagnard (1987), estos valores serían inferiores al promedio de los normales (0,2% ms). Sin embargo, no se alcanza el rango de deficiencia (0,8-0,10% ms), donde ya podrían apreciarse síntomas visuales. La caída de concentración que se produce tras la primera toma de muestras podría estar relacionada con los altos valores de nitrógeno que se mantienen durante este periodo, de hecho están el límite más alto de los recopilados por Gagnard (1987). En este sentido, puede observarse que en 1999 se registraron los menores contenidos de nitrógeno concomitantes con altos valores de fósforo posiblemente debido a un cierto antagonismo entre ambos elementos. De hecho, la elevación del contenido de fósforo tiende a disminuir la asimilación de nitrógeno y viceversa (Westwood, 1982).

Aunque la literatura que trata de las posibles relaciones entre alteraciones del fruto durante la etapa de almacenamiento y la concentración de elementos minerales en hoja es muy escasa, la mayor parte está dedicada al potasio. En este sentido Tomala (1997) encuentra una alta correlación de signo negativo entre el valor de potasio foliar el potencial de almacenamiento de las manzanas. Según este mismo autor, este tipo de desórdenes fisiológicos del fruto pueden limitarse manteniendo la concentración de potasio foliar por debajo de 1,2% ms. En nuestro caso, el contenido de potasio foliar a lo largo de la estación disminuye de forma

progresiva conforme se acerca la recolección del fruto. Prácticamente todos los valores, exceptuando el de último de 1999 (156 DTPF), que se aparta de la tendencia seguida en los años anteriores, son superiores a este umbral, sugiriendo que la incidencia del bitter-pit, podría ser alta. En el periodo comprendido entre 75-105 DTPF se observa que la concentración se mantiene en niveles altos aunque dentro del rango considerado como adecuado según las referencias citadas anteriormente. Esta alta concentración de potasio podrá influir negativamente en la absorción de calcio.

El papel fisiológico del magnesio en la planta está relacionado con el equilibrio nutricional entre este elemento, potasio y calcio. Las propiedades bioquímicas y biofísicas del magnesio, y por tanto su comportamiento en la planta, son intermedias entre las del K y las del Ca. Así, sus sales inorgánicas y orgánicas son menos solubles que las del K, pero más que las del Ca. Dependiendo del desplazamiento del equilibrio entre estos tres nutrientes, el contenido de Mg puede incrementarse con la edad de la planta, como en el caso del Ca foliar, o decrecer como el K (Marcelle, 1995). Esto explicaría la disparidad de comportamiento de este elemento en los periodos de estudio. En los dos primeros años, al igual que en las observaciones recogidas por Gagnard (1987), su concentración aumenta, especialmente a partir de los 120 DTPF, pero en 1999, de acuerdo con los resultados de Nurzynski et al. (1990), desciende en una proporción similar a la del aumento observado en los años anteriores.

4.3.1.2. Calcio

Durante los tres años del estudio, la evolución del calcio en la hoja siguió la misma tendencia, aumentando su concentración a medida que el fruto iba ganando peso (*Figura 31; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Excepto en la última fecha de muestreo (157 DTPF) su porcentaje sobre materia seca se

encuentra siempre por debajo de 1,4 - promedio de los valores considerados adecuados por Gagnard (1987) -. Como puede observarse, este comportamiento es el opuesto al que siguen el resto de los elementos estudiados hasta el momento. Las plantas absorben el calcio únicamente en forma iónica y es transportado hacia la parte aérea por el flujo de transpiración a través del xilema. A diferencia de K^+ y Mg^{2+} , iones que, como el nitrógeno y los compuestos de fósforo, son fácilmente transportados en el floema (Tagliavini et al., 2000); el calcio, se transporta exclusivamente a través de los vasos del xilema (Bergmann 1992), bien en forma iónica o acompañado con los ácidos málico o cítrico (Vang-Peterson, 1980). Así, se acumula en los órganos de forma estable e irreversible, a medida que estos envejecen, como en el caso de las hojas cuya concentración aparece reflejada en la **Figura 31**; **Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

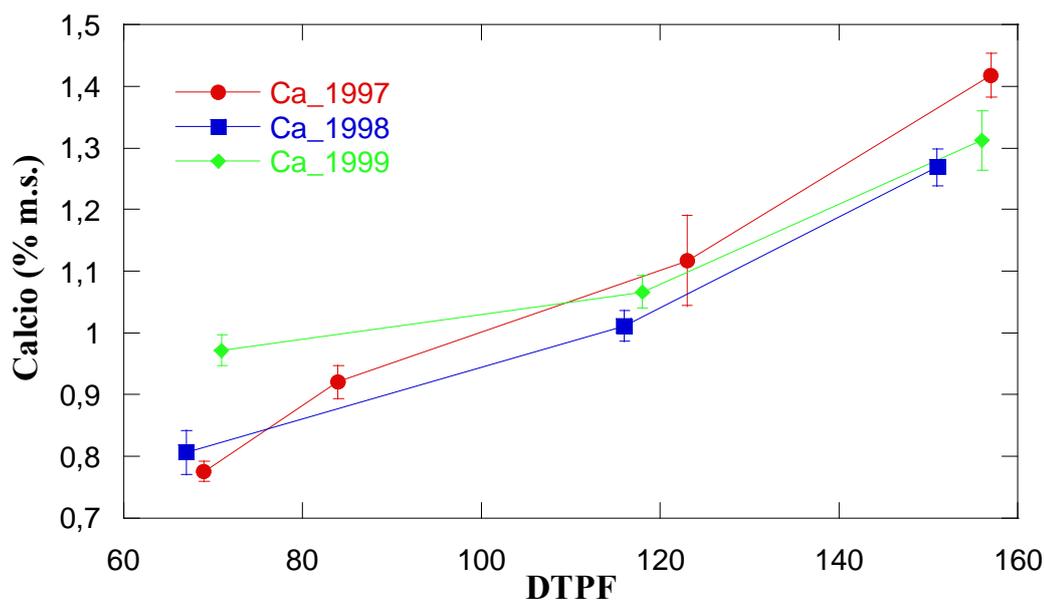


Figura 31: Evolución de calcio (% de materia seca) en hoja

4.3.1.3. Micronutrientes

En la *Figura 32*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra la evolución de la concentración foliar de los cuatro microelementos estudiados durante los tres años del estudio.

En general, el contenido de hierro en las plantas varía considerablemente. Se pueden estimar como normales contenidos en hoja entre 60 y 300 ppm, mientras que en plantas deficientes pueden oscilar entre 10 y 30 ppm. El contenido de hierro total dice muy poco acerca del estatus nutricional de la planta, ya que los niveles en casos de deficiencia, pueden ser iguales e incluso superiores a los de plantas normales (Monge et al., 1991). En nuestro experimento, la concentración de hierro presente en la hoja, se mantiene estable durante la mayor parte de la estación. Sin embargo, alrededor de los 120 días tras plena floración esta concentración aumenta, de forma muy acusada en 1998, pero también se observa en el resto de años. Por otra parte, según el promedio de los valores de referencia recogidos por Gagnard (75-105 DTPF), la concentración foliar de hierro se encuentra por debajo del normal. Sin embargo, no se apreciaron síntomas visuales de deficiencia en las hojas, debido a que los rangos de concentración descritos como normales para el hierro (entre 60 y 240 ppm) y, como se verá más adelante, también para el resto de micronutrientes, son muy amplios, y todos los valores representados en la figura se sitúan por encima del mínimo.

En el tejido foliar, el manganeso está asociado funcionalmente con proteínas del aparato responsable de la lisis del agua y por lo tanto es indispensable para que se genere el flujo electrónico fotosintético. También existen datos que parecen indicar papeles adicionales del manganeso en otras proteínas extracloroplásticas como la manganeso-superóxido dismutasa de los peroxisomas (Monge y Val, 1990). Hasta aproximadamente los 120 DTPF, y exceptuando los dos primeros muestreos del año 1998, la concentración foliar de manganeso se sitúa por debajo del rango descrito como normal (25-120 ppm). A partir de julio de 1997 y 1998, esta

concentración aumenta espectacularmente, hecho que no se repite en el último año del experimento. Si se observa con atención, en el último punto de muestreo, que coincide con la recolección, la concentración de Mn disminuye con el transcurso de los tres años. Esto podría indicar un agotamiento del suelo en este nutriente. De hecho, en los dos últimos años (2000-2001), se comenzaron a observar claros síntomas visuales que indicaban la deficiencia de este elemento en hoja. Como ejemplo en la *Figura 33*; *Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se muestra una imagen típica de la deficiencia, que fue tomada en agosto de 2001 en árboles de la misma parcela del experimento.

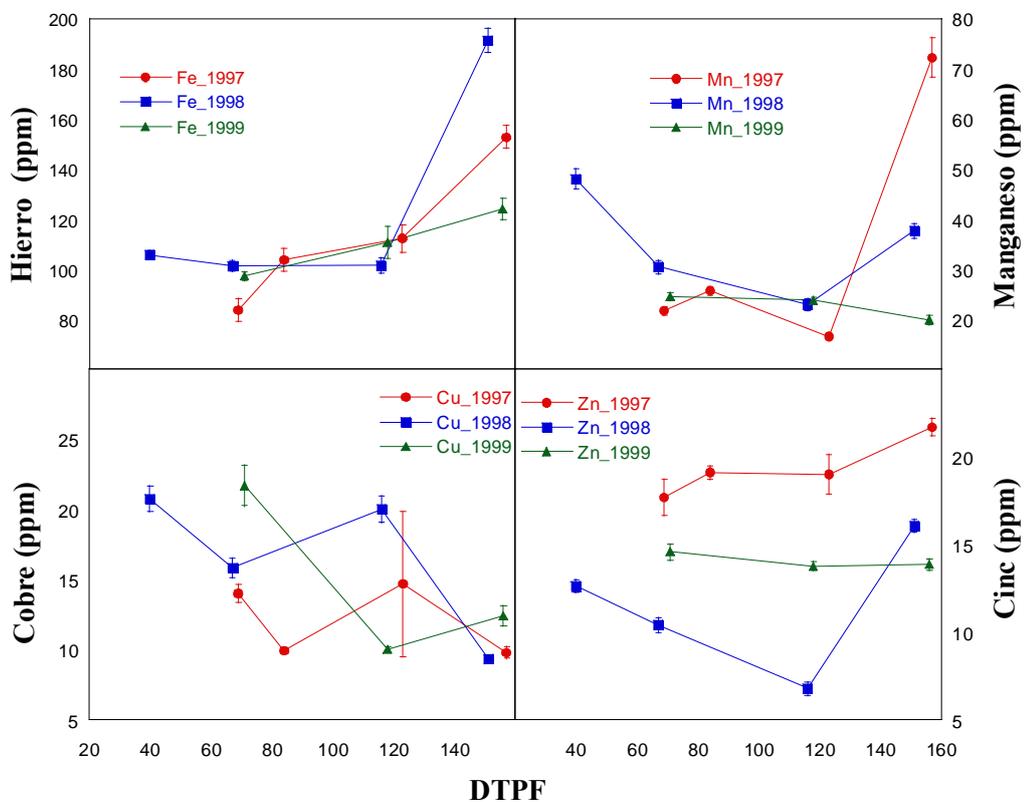


Figura 32: Evolución de micronutrientes en hoja (mg kg^{-1} de materia seca)

Cerca del 70% del cobre foliar está contenido en los cloroplastos y de este más del 50% está en forma de plastocianina. Interviene en un gran número de

enzimas, como activador o formando parte de ellas como grupo prostético. Al igual que el hierro puede reducirse reversiblemente lo que le permite intervenir en un gran número de procesos redox (Val y Monge, 1990a). En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa cómo el cobre presenta una evolución bastante irregular a lo largo de los tres ciclos de cultivo estudiados. Sin embargo, se aprecia claramente una tendencia descendente conforme avanza la estación. En todos los casos, los valores se situaron dentro del rango normal, y no pudieron apreciarse síntomas de deficiencia que se producirían por debajo de las 3 ppm en tejido foliar. La deficiencia de cobre en manzano se produce muy raramente, ya que este elemento es un constituyente habitual de los numerosos fitosanitarios que normalmente se aplican en las prácticas culturales (Gagnard, 1987).

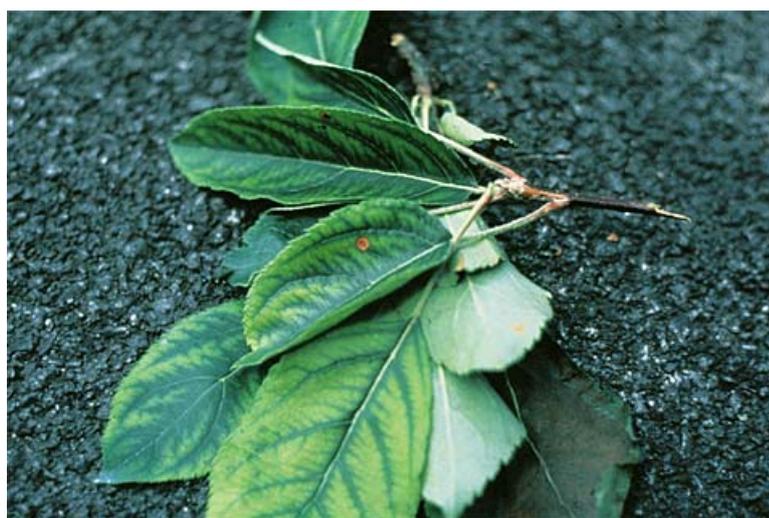


Figura 33. Hojas de manzano Golden Smoothie afectadas por deficiencia de Mn. Finca El Cerradico, Quinto de Ebro, Zaragoza

El síntoma que mejor caracteriza la deficiencia de cinc es el enanismo, la hoja pequeña y la disposición de las hojas en forma de "roseta". Estas

manifestaciones están relacionadas con alteraciones en el metabolismo del ácido Indol Acético (IAA); ya que el cinc interviene en la síntesis de triptófano, precursor de las auxinas (Val y Monge, 1990b). Según Gagnard (1987), el rango de valores adecuados de cinc en hoja de manzano se sitúa entre 9-105 ppm de materia seca. Sin embargo, según Benton-Jones et al. (1991), el rango de suficiencia para el manzano se sitúa entre 20 y 100 ppm. Por debajo de estos valores se producirían situaciones de escasez o incluso deficiencia. En nuestro caso, la práctica totalidad de valores registrados fueron inferiores a 20 ppm y, en efecto, con cierta frecuencia pudieron apreciarse en el árbol formaciones foliares en forma de roseta (*Figura 34*). La escasez en este microelemento, ya se puso de manifiesto al realizar el diagnóstico nutricional de la plantación por el método DOP (*Tabla 9; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*).



Figura 34. Hojas de manzano Golden Smoothie afectadas por deficiencia de Zn. Finca El Cerradico, Quinto de Ebro, Zaragoza

Como resumen del contenido y comportamiento de los nutrientes en hoja, durante los tres años del experimento, podría destacarse que nitrógeno, potasio, fósforo y cobre disminuyen su concentración a lo largo de la estación; mientras que las de calcio, hierro y magnesio, aumentan. El comportamiento de cinc y manganeso no sigue un patrón tan definido como en los otros casos. Estos resultados están, en líneas generales, de acuerdo con los recogidos por Gagnard (1987) de diversos autores. Estos comportamientos podrían explicarse en función de la movilidad de los diversos nutrientes en los órganos. A medida que las hojas envejecen acumulan Mg, Ca, S y otros elementos poco móviles, como el Fe, mientras que los elementos más fácilmente traslocables, como N, P y,

especialmente, K se redistribuyen hacia las hojas jóvenes disminuyendo su concentración a medida que la planta madura (Gil, 1995).

4.3.2. Relaciones entre nutrientes

La relación entre los distintos nutrientes es un parámetro importante debido a los efectos antagónicos o sinérgicos que presentan ciertos elementos minerales. Por su relación con la calidad del fruto se ha descrito la importancia de considerar, en hoja, las relaciones entre potasio, magnesio y calcio (*Figura 35; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Se ha seguido la evolución de la relación entre el potasio y el calcio a lo largo del periodo de desarrollo, observándose cómo en los tres años la tendencia es similar, disminuyendo hasta llegar a valores comprendidos entre 1 y 1,5 al final de la cosecha. Atendiendo a la relación entre potasio, magnesio y calcio, en la *Figura 35; Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se observa que la tendencia de esta relación es similar a la anterior aunque, como es lógico al sumar la contribución del magnesio, los valores son algo más altos.

Los resultados de Sió et al., (1998), obtenidos en Lleida en el periodo 1995-97 relativos a los contenidos minerales en hoja de manzanos Golden y la posterior incidencia de bitter pit en fruto, demuestran que el nivel de calcio en hoja y las relaciones K/Ca y (K+Mg)/Ca son los mejores predictores de la incidencia de esta fisiopatía. Los niveles de calcio en hoja se correlacionaron negativamente con la incidencia de bitter pit y por el contrario los valores de las relaciones K/Ca y (K+Mg)/Ca se relacionaron positivamente. Estos resultados coinciden con los encontrados por Sharples (1980) para el calcio y también por los descritos por Tomala et al. (1993). En el mismo trabajo de Sió, se afirma que no se obtienen mejores correlaciones utilizando los contenidos minerales en fruto con respecto a los foliares. Considerando que los análisis foliares son comúnmente utilizados en el control del estado nutritivo de los manzanos y que

además se dispone de los resultados con dos meses de antelación a la recolección, el empleo de los análisis foliares en las condiciones donde se ha desarrollado la experiencia, puede ser una herramienta no desdeñable en la predicción del bitter pit. Este tipo de relaciones entre los contenidos en hoja y bitter pit también ha sido descrito por Tomala et al. (1993) con variedades distintas a la Golden.

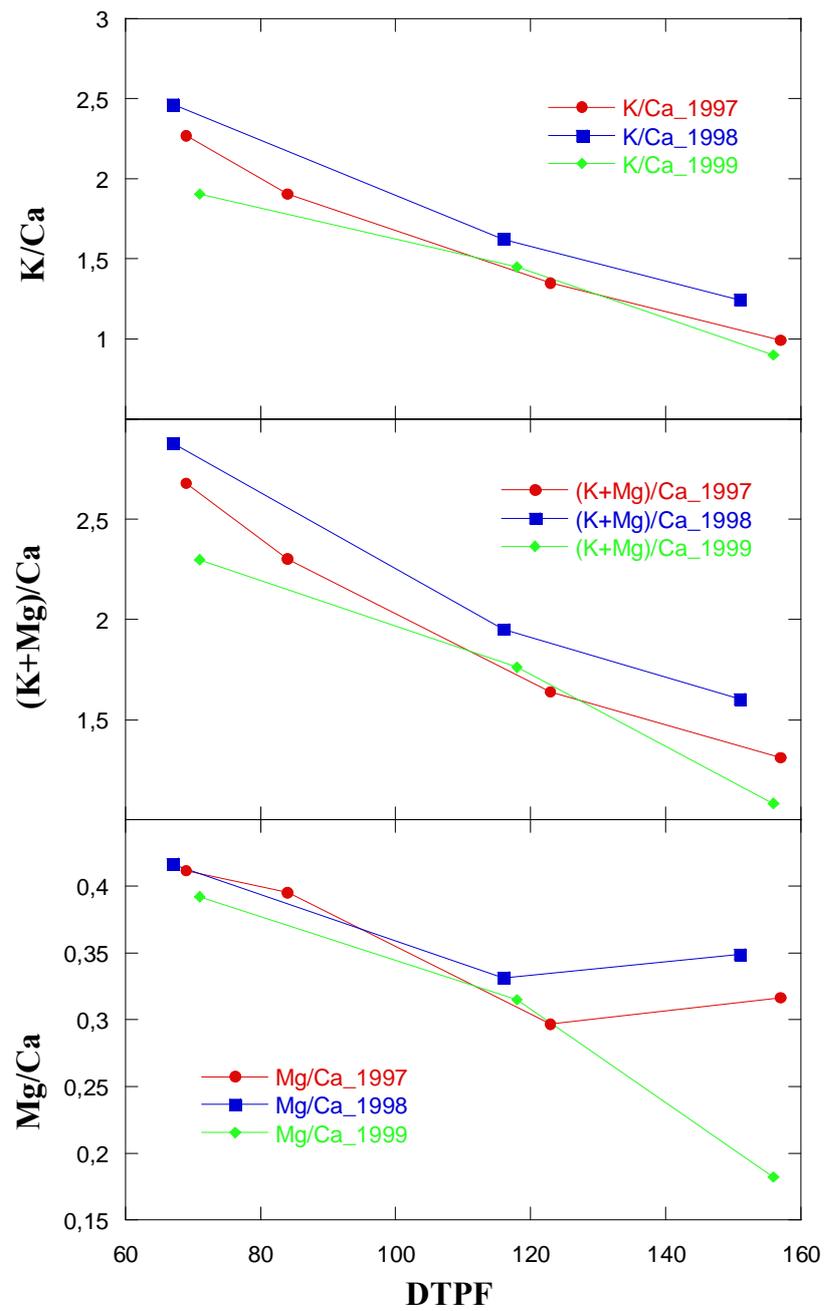


Figura 35: Evolución de alguna de las relaciones de interés entre nutrientes foliares.

4.3.3. Elementos minerales en Fruto

Numerosos los autores que han encontrado relaciones entre el contenido mineral del fruto y la incidencia de bitter-pit (Shear, 1974, 1980; Sharples, 1980; Terblanche, 1980; Bramlage, 1990). En un cultivo especializado como el manzano, la calidad del producto, su aptitud para la conservación y manejo son más importantes que el nivel de producción que puede alcanzarse. En los últimos años se ha trabajado, por una parte, en poner de manifiesto la relación que tiene el contenido mineral del fruto con estos aspectos y, por otro lado, en cómo aprovechar esta información para programar el destino y utilización de la fruta según el resultado de los análisis. Así, el análisis mineral de frutos es una metodología que puede ser utilizada para prever la capacidad de conservación de estos frutos durante su almacenamiento (Huguet, 1981), permitiendo programar, de una manera racional, el llenado de las cámaras frigoríficas que posteriormente habrán de ser abiertas de una forma escalonada según las necesidades del mercado (Casero et al., 1990).

En los tres años del experimento, al igual que en las hojas, el contenido mineral en fruto no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, para un nivel de confianza del 95%, en ninguna de las fechas en las que se tomaron muestras. Por lo tanto, los resultados de los análisis de nutrientes en fruto se presentan como media de todos los árboles estudiados.

4.3.3.1. Macronutrientes

Durante el desarrollo del fruto, la pulpa de la manzana aumenta los contenidos de todos los nutrientes. Se produce una entrada continuada de elementos aunque la concentración de los mismos disminuye con el tiempo debido a que el crecimiento del fruto tiene lugar a mayor velocidad que la acumulación de nutrientes (Westwood, 1982). Gráficamente, esto se traduce en un descenso continuado de la concentración de los elementos conforme aumenta el

valor de los días tras la plena floración (*Figura 36;Error! No se encuentra el origen de la referencia.*).

Según Shear y Faust (1980) la susceptibilidad a desordenes fisiológicos aumenta cuando el contenido de nitrógeno en fruto es alto. Estos frutos tienden a ser grandes, blandos, desarrollan poco color, y son susceptibles a la abscisión prematura y a sufrir, entre otras fisiopatías, bitter-pit, plara, vitrescencia y escaldado (Bramlage, 1993). La mayor parte de estas afecciones pueden estar causadas indirectamente por la sobrealimentación nitrogenada, al desarrollar los árboles un exceso de vigor que puede reducir drásticamente la concentración de calcio en fruto por competición con el crecimiento de otros órganos vegetativos. Además, al aumentar el tamaño del fruto se produce un efecto de dilución de los nutrientes que contiene (Perring y Jackson, 1975).

En 1997 únicamente se tomaron muestras de fruto para análisis mineral en el momento de la recolección, que tuvo lugar a los 157 DTPF. En la ya descrita *Tabla 11;Error! No se encuentra el origen de la referencia.*, aparecen los valores nutricionales correspondientes a dicho muestreo y en la *Tabla 13;Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se muestran las relaciones entre nutrientes más importantes para predecir la capacidad de almacenamiento de la cosecha.

En la *Figura 36;Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se observa el descenso de la concentración de nitrógeno durante el desarrollo del fruto. En el momento de la recolección los valores fueron muy altos en 1997 (0,51% ms; *Tabla 11;Error! No se encuentra el origen de la referencia.*), pero en 1998 y 1999 disminuyeron hasta alcanzar prácticamente el promedio de los normales (0,39 y 0,32% ms respectivamente). Teniendo en cuenta los valores de referencia expuestos en la *Tabla 10;Error! No se encuentra el origen de la referencia.*, pudieron apreciarse excesos de nitrógeno en 1997 y 1998, para

aproximarse al índice DOP 0 en 1999 (*Tabla 12;Error! No se encuentra el origen de la referencia.*).

Bajas concentraciones de fósforo en fruto pueden afectar negativamente la calidad del fruto en forma de colapso por senescencia o por baja temperatura, pero no está claro que estos efectos puedan relacionarse con el calcio en fruto.

El fósforo en 1997 se encuentra en exceso, mientras que en 1998 y 1999 su nivel se aproxima al valor de referencia nutricional (0,07 % m.s.). La tendencia del fósforo en fruto es similar a la del nitrógeno, presentando un descenso a lo largo del periodo de desarrollo del fruto.

Altas concentraciones de potasio en manzanas, hacen descender su capacidad de almacenamiento. Además, los frutos con el potasio alto son más susceptibles a la plara, bitter-pit y al ataque de patógenos. Si bien, la mayor parte de estos efectos pueden atribuirse a la interacción entre K y Ca (Bramlage, 1993). En nuestros experimentos, también se observa la tendencia, al igual que el resto de los nutrientes, a disminuir conforme el fruto se va desarrollando. En nuestro caso, no pudieron detectarse excesos de potasio en el momento de la cosecha como lo indican los valores DOP de la *Tabla 12;Error! No se encuentra el origen de la referencia.*. De esta forma, la alta incidencia de bitter-pit se produjo en las tres campañas no puede atribuirse a un exceso de este elemento.

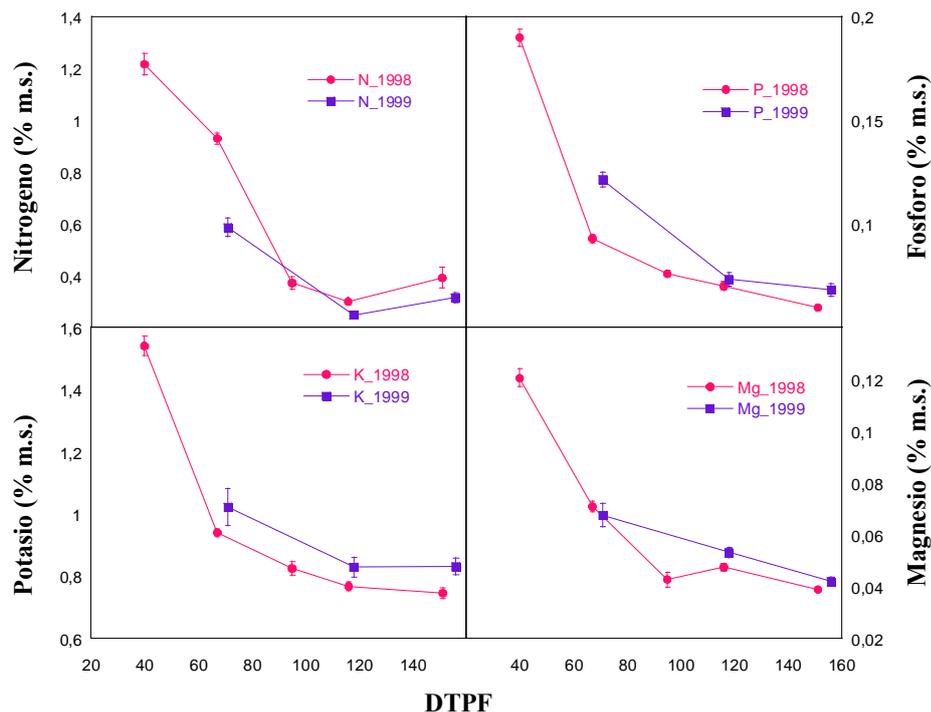


Figura 36: Evolución de macronutrientes (% de materia seca) en fruto

Muchos de los efectos del magnesio en la calidad del fruto se pueden atribuir a su antagonismo con el potasio y, también, a que compite con calcio por los lugares de fijación durante su transporte (Marcelle, 1995). En nuestro caso, además del, ya observado previamente, efecto de dilución a lo largo de los dos ciclos estudiados, los niveles de magnesio se encuentra en una concentración muy próxima a la del valor de referencia (0,035% m.s.) en el momento de la cosecha.

4.3.3.2. Calcio

El calcio es un elemento muy importante en la calidad de la manzana. Un adecuado contenido en el fruto permite reducir la incidencia del bitter pit y de otras fisiopatías. Un alto nivel también reduce la incidencia de enfermedades de frigoconservación y mejora su aptitud para la manipulación y el transporte (Jarén et al, 1994).

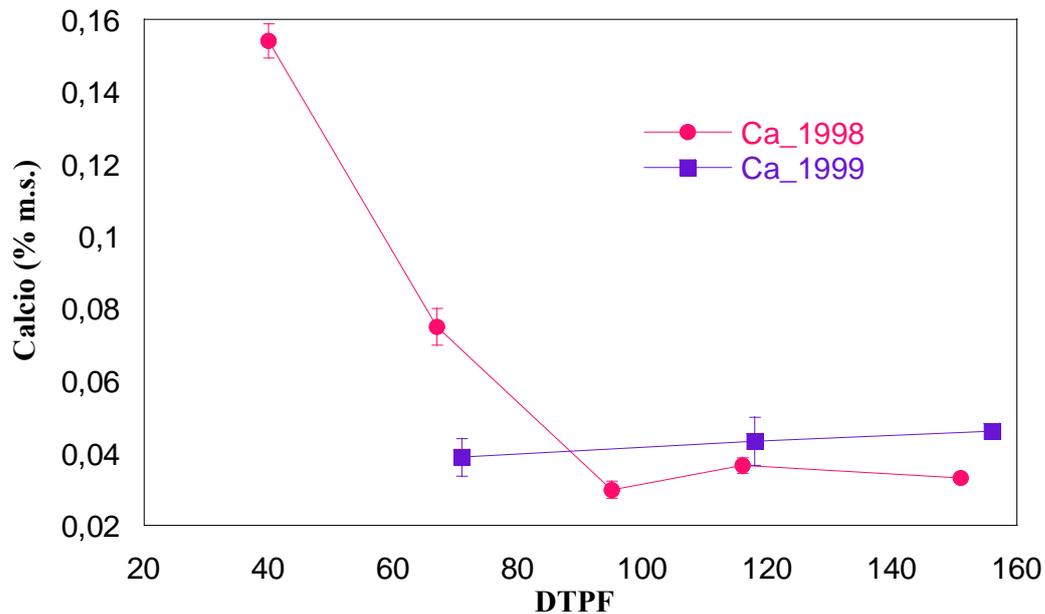


Figura 37: Evolución del calcio (% de materia seca) en fruto

En 1998, el calcio (*Figura 37; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*) al igual que el resto de macronutrientes desciende su concentración a medida que el fruto se va desarrollando hasta aproximadamente los 95 DTPF. A partir de esa fecha y hasta el momento de la recolección del fruto, el contenido de calcio varía poco. En los tres años, el contenido de calcio en cosecha está muy por debajo de los niveles encontrados en manzanas con buena capacidad de conservación. Sin embargo, parece que la nutrición cálcica mejora de año en año, de forma que en 1999, se acerca al valor considerado como adecuado. En cualquier caso, los porcentajes de incidencia de bitter-pit de esta parcela siguieron siendo muy altos (>80%), no solo en los tres años del estudio, sino también en la campaña de 2000.

4.3.3.3. Micronutrientes

Apenas existe información acerca de la influencia de los micronutrientes en la fisiología del fruto y menos aún en su calidad postcosecha. Únicamente Marcelle (1995), refiere que encuentra aumentos de la concentración de cinc en fruto concomitantes con los de calcio. Sin embargo, sugiere la existencia de un umbral a partir del cual posteriores aumentos de cinc inhiben la entrada de calcio al fruto.

El mencionado autor también describe los beneficios de los tratamientos con aspersiones de manganeso para la persistencia del color en manzanas verdes. En la *Figura 38*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se representa el contenido en fruto de los cuatro micronutrientes estudiados. En los dos últimos años, el hierro se encuentra en exceso sobre el óptimo nutricional. En 1998 su concentración varía poco a lo largo de todo el desarrollo del fruto, pero en 1999 se produce un crecimiento muy rápido para llegar a un nivel, en cosecha, por encima del de referencia. Manganeso y cinc, siguen ambos la misma tendencia disminuyendo su concentración conforme avanza la estación. Cobre se comporta igual que los anteriores microelementos, pero en 1998, aproximadamente a los 95 DTPF se produce un espectacular aumento de concentración que posiblemente este relacionado con el uso de plaguicidas.

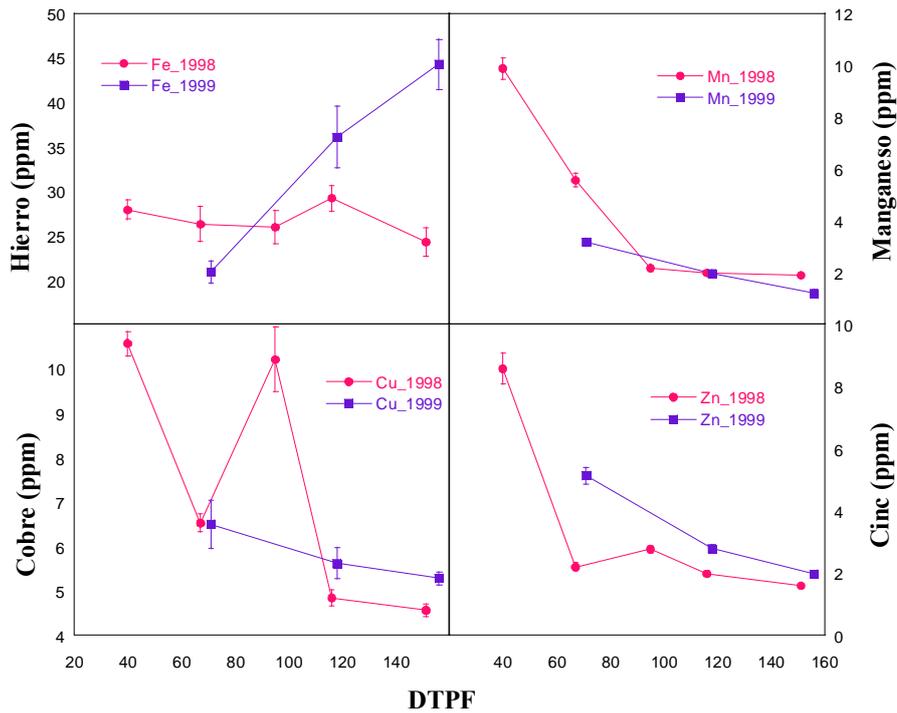


Figura 38: Evolución de micronutrientes (% de materia seca) en fruto

4.3.3.4. Relaciones entre nutrientes

La relación entre los distintos nutrientes, como ya se ha dicho antes, es un parámetro importante debido a los efectos antagónicos que algunos elementos minerales presentan. De este modo, es interesante estudiar las relaciones entre potasio, magnesio y calcio (*Figura 39; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*).

La relación K/Ca se ha utilizado profusamente como parámetro de predicción de la calidad de almacenamiento de las manzanas. Se han encontrado correlaciones positivas entre la relación K/Ca en fruto con la incidencia de bitter pit (Tomala, 1997; Sió et al., 1998) y con otros desórdenes fisiológicos y patogénicos (Marcelle, 1995). La relación entre el potasio y el calcio tiene gran

importancia debido al antagonismo que existe entre estos dos elementos minerales. El hecho de que se relacione la incidencia de bitter pit con los contenidos minerales en fruto, se basa en el papel que juega el calcio en los procesos bioquímicos que inducen la aparición de esta fisiopatía (Sió et al., 1998). Al igual que en el caso de las hojas, el calcio presente en el fruto, en el momento de la recolección, se correlaciona negativamente con el bitter pit durante el almacenamiento (Ferguson y Watkins, 1989; Sió et al., 2000), y las relaciones K/Ca y (K+Mg)/Ca se correlacionan positivamente (Nachtigall y Freire, 1998).

La mayor parte de los efectos de magnesio en la calidad de la fruta pueden explicarse de dos formas: el Mg es un antagonista de K y compite con Ca por los sitios de unión durante su transporte. En este sentido, las observaciones de Marcelle (1995), demuestran el efecto perjudicial del magnesio en la capacidad de almacenamiento de las manzanas. Así, este autor encuentra que la firmeza del fruto se correlaciona negativamente con el contenido de magnesio en fruto y también con el de potasio. El estudio de los valores de la relación (K+Mg)/Ca proporciona información acerca del efecto conjunto del K y del Mg como inhibidores de la acumulación de calcio en el fruto.

En 1997, se obtuvieron valores muy altos debido a la baja concentración de calcio en fruto, indicando que estas manzanas no eran adecuadas para el almacenamiento y que su susceptibilidad a desarrollar bitter pit era muy alta. Otra de las relaciones estudiadas fue (K+Mg)/Ca, ya que tanto potasio como magnesio impiden la acumulación de calcio en el fruto (Marcelle, 1995) especialmente cuando este último es deficiente.

Tabla 13: Relaciones entre nutrientes de interés, en el fruto de la cosecha de 1997

K/Ca	(K+Mg)/Ca	Mg/Ca
67,82 ± 4,89	71,43 ± 5,14	3,52 ± 0,27

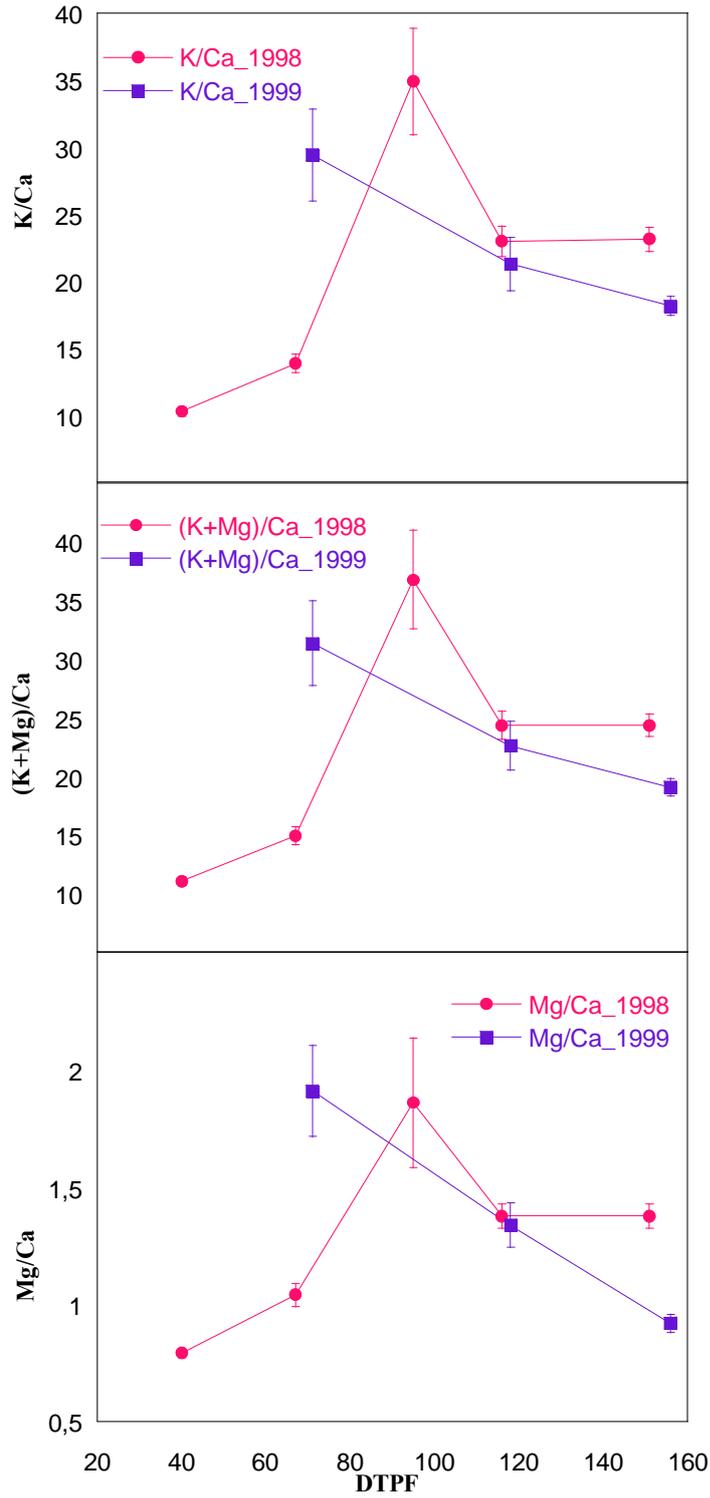


Figura 39: Evolución de las relaciones estudiadas en fruto

Si se observan los gráficos que se refieren al año 1998, la tendencia de esta relación es la de aumentar a medida que el fruto se va desarrollando hasta los 95 DTPF momento en que empieza a descender situándose entorno a valores de 20 a 25, límite a partir del cual se considera que existe riesgo de bitter pit. El segundo gráfico relaciona potasio y magnesio con calcio, y en él se comprueba la existencia de la misma tendencia que en la relación anterior ya que se suma la contribución del magnesio. En 1999 el primer valor del muestreo resulta ser el más alto de la serie, por lo que cabe suponer una tendencia similar a la del año anterior, si bien el tiempo al que se alcanza el valor máximo de esta relación es más temprano que en el caso anterior. Quizás esto se deba a que en 1999 se obtuvieron frutos más pequeños que en los años anteriores (*Figura 26; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*) y, además, la tasa de crecimiento también fue más baja (*Tabla 6; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Por lo tanto, el efecto de dilución del calcio por aumento del tamaño de fruto tendría menos importancia que en las estaciones anteriores.

4.3.3.5. Tasa de acumulación de nutrientes en fruto

Como se menciona en la introducción (apartado 1.1.4.), desde Shear y Faust (1971) y posteriormente Faust (1989), basándose en su propio trabajo y en el de otros autores, se viene afirmando que la acumulación de calcio se produce principalmente en la primera fase del crecimiento del fruto. Es decir, durante las primeras 4-6 semanas el fruto acumula el 90% del calcio que contendrá al final del proceso de desarrollo. En el periodo siguiente la concentración de calcio se diluye con el rápido crecimiento de la masa del fruto. Sin embargo, otros autores como Tomala et al. (1989) describen un incremento continuo del calcio en los frutos de las variedades McIntosh y Spartan. Más recientemente Plisek (1995) demuestra que el contenido de calcio por fruto aumenta de forma lineal en función de la masa del fruto en el periodo comprendido entre junio y la recolección.

Tomando como base la idea de este mismo autor, nos propusimos verificar, en nuestras condiciones de trabajo, la posibilidad de establecer un modelo de la incorporación al fruto de macro y micronutrientes, haciendo especial énfasis en el calcio.

En la *Figura 40*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se representa, para los años 1998 y 1999, la cantidad de calcio en fruto (g fruto^{-1}) en el eje de ordenadas y en el de abscisas la masa de cada fruto. Como se ha referido repetidamente, el calcio es uno de los nutrientes más importantes en la nutrición de los frutales, su movilidad en el interior de la planta es muy limitada, y llega en escasa proporción a los frutos (Casero, 1995).

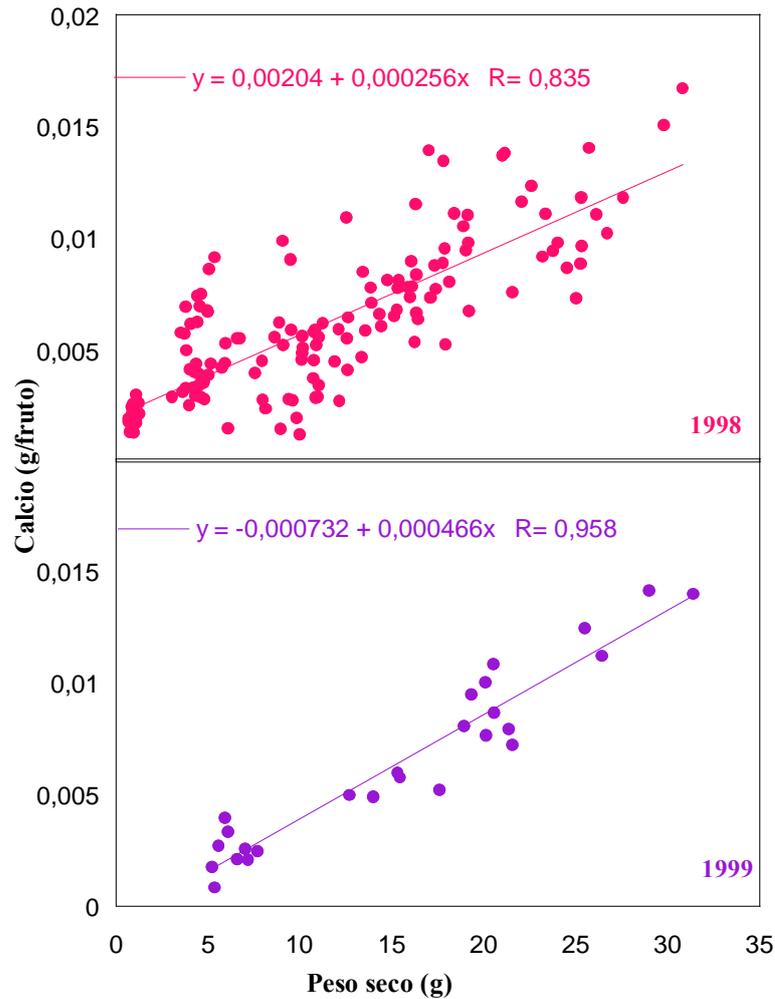


Figura 40: Tasa de incorporación de calcio al fruto en función de la masa del mismo

De ser cierta la teoría de Shear y Faust (1971), a partir de un cierto tamaño de fruto, la cantidad de calcio debería aproximarse a una constante, sin embargo, en cualquiera de los dos años se observa un incremento continuo de calcio a lo largo de los ciclos de desarrollo. Así, pueden relacionarse, mediante una regresión lineal, la cantidad de calcio en cada fruto con su peso, indicando, la pendiente de dicha recta, la tasa de asimilación de este elemento en gramos de calcio por cada gramo de aumento en materia seca. En los dos años las correlaciones fueron estadísticamente significativas y los coeficientes de correlación fueron capaces de

explicar el 83 y 95% de la variabilidad obtenida. Comparando dichas pendientes puede establecerse que en 1999 la tasa de acumulación de calcio fue casi el doble que la del año anterior

Una vez comprobado el aumento lineal del contenido de calcio en el fruto en función de la materia seca acumulada, se creyó interesante aplicar este modelo de estudio al resto de nutrientes. Aunque se ha descrito en el apartado 1.1.4. de la Introducción que la toma de alguno de los macronutrientes se realiza de forma continuada a lo largo del periodo de desarrollo del fruto, hasta el momento no se ha descrito detalladamente la incorporación de dichos nutrientes a la masa del fruto. Esto es especialmente cierto en el caso de los micronutrientes, de los que apenas existe información, no ya de valores de referencia en fruto, como se ha visto en otros apartados de este trabajo, sino de su papel en la fisiología del fruto, y menos aún de la incorporación a sus estructuras.

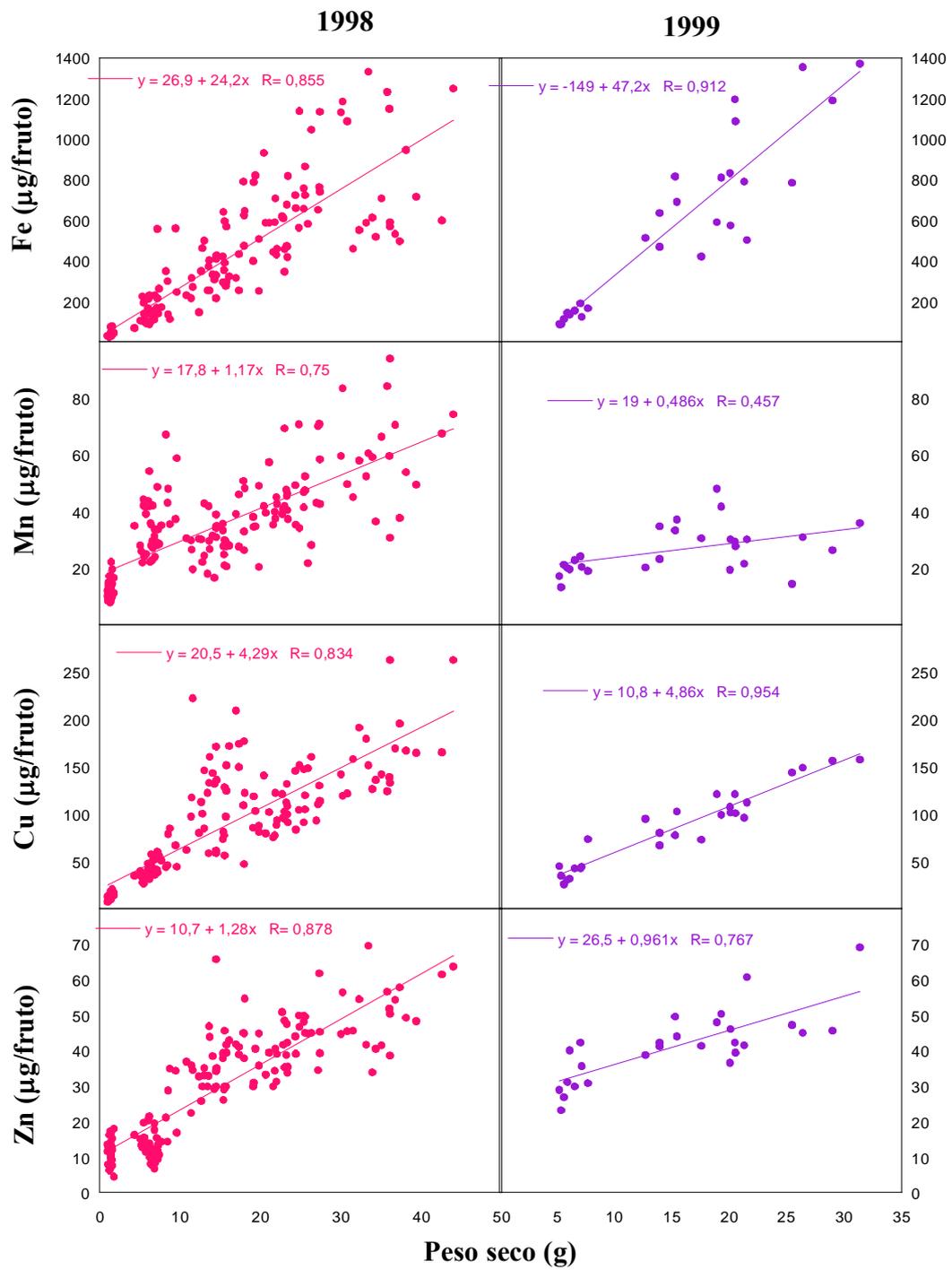


Figura 41: Tasa de acumulación de micronutrientes para 1998 y 1999

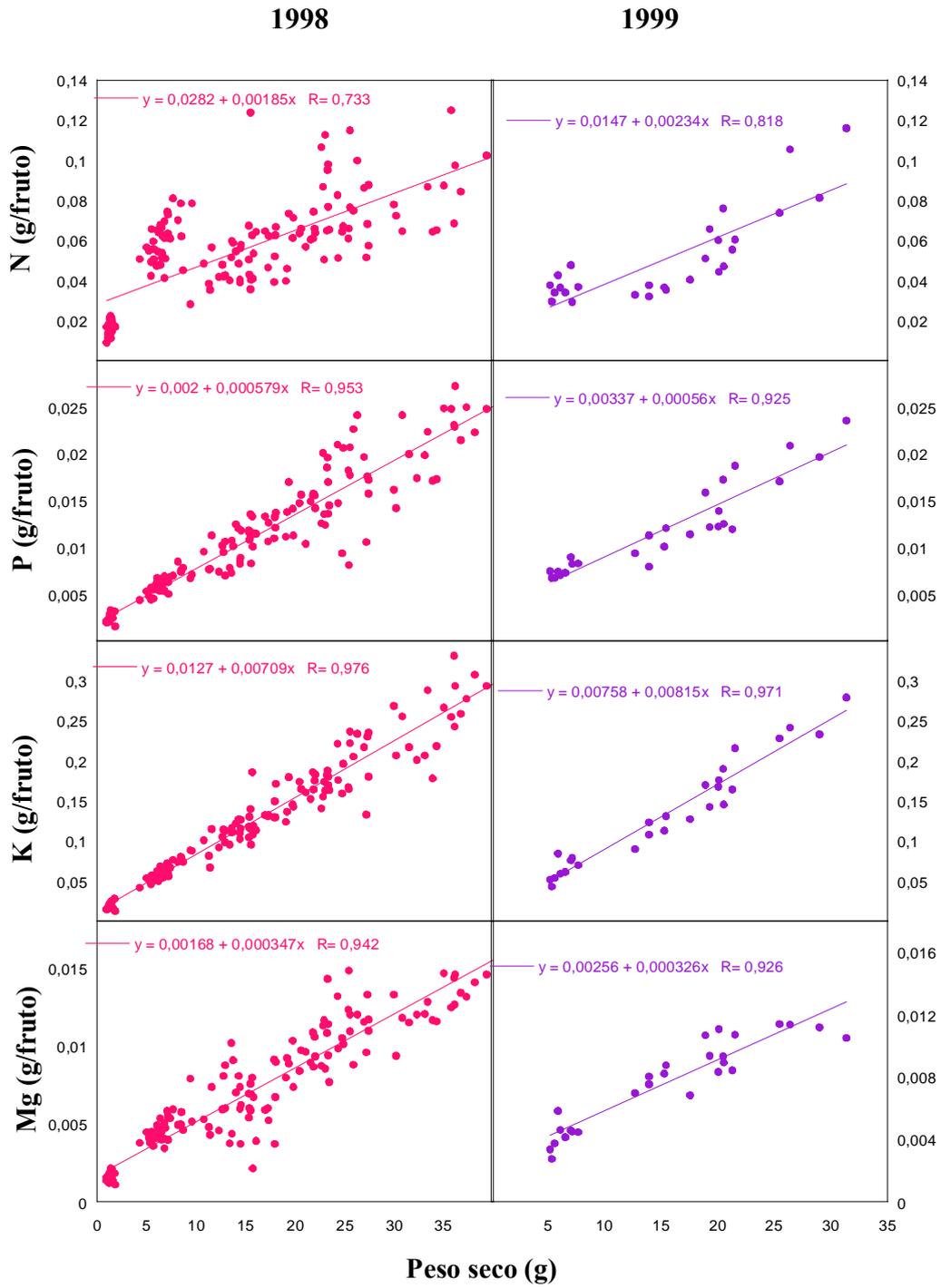


Figura 42 Tasa de acumulación de macronutrientes para 1998 y 1999

En las *Figura 41*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** - *Figura 42*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa que efectivamente, también pueden establecerse regresiones lineales para cada uno de los macro y micronutrientes estudiados en los dos años de recogida de datos. El contenido mineral en el fruto aumenta linealmente de forma significativa ($P < 0,05$) en todos los casos a excepción del cobre en 1999. Destacar que, en la *Figura 41*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, la acumulación de manganeso en 1999 se produce de forma más lenta y en una cantidad próxima a la mitad que en 1998, en cambio el hierro presenta una ritmo de incorporación mayor en 1999. El resto de micronutrientes se acumulan a un ritmo similar en ambos años estudiados.

Tabla 14: Tasa de acumulación de nutrientes en manzanas (mg g^{-1} de materia seca, para los macro, y $\mu\text{g g}^{-1}$ para los micronutrientes). Los datos corresponden a dos ciclos de desarrollo (años 1998 y 1999). Entre paréntesis se muestran los coeficientes de correlación de las rectas, $p < 0,01$

	1998	1999
Macronutrientes		
N	1,85 (0,692**)	2,34 (0,818**)
P	0,58 (0,953**)	0,56 (0,925**)
K	7,09 (0,976**)	8,15 (0,971**)
Mg	0,35 (0,942**)	0,33 (0,926**)
Ca	0,26 (0,835**)	0,47 (0,894**)
Micronutrientes		
Fe	24,2 (0,823**)	47,2 (0,912**)
Mn	1,17 (0,750**)	0,49 (0,457*)
Cu	4,29 (0,774**)	4,86 (0,954**)
Zn	1,28 (0,855**)	0,96 (0,767**)

La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). El valor entre paréntesis corresponde al coeficiente de correlación de Pearson.

En la *Tabla 14;Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se resumen los valores de las pendientes de las rectas representadas en las figuras anteriores. A la vista de estos datos se deduce que, entre los macronutrientes, la mayor tasa de acumulación se produce en el caso del potasio. Esto no es extraño, si se tiene en cuenta que este elemento es el más abundante en el citoplasma celular, contribuyendo a mantener el potencial osmótico de las células (Marschner, 1995). Por lo tanto, es lógico suponer que aumente en mayor proporción que el resto de los elementos a medida que se incrementa el volumen del fruto. Respecto al resto de macronutrientes, solamente mencionar que el nitrógeno se acumula en mayor proporción que el fósforo y este último en mayor grado que calcio y magnesio.

En el caso de los micronutrientes, la mayor acumulación se produce en el caso del hierro, elemento esencial en la respiración y la fotosíntesis al formar parte de la ferredoxina y clorofila. Manganeso, cobre y zinc presentan valores apreciablemente inferiores.

4.4. Análisis foliar

El análisis foliar permite obtener los conocimientos básicos sobre el crecimiento, producción y cualidades de árboles frutales en diferentes suelos y condiciones climáticas. La fertilidad del suelo puede ser evaluada a través del análisis químico del suelo o de manera más directa usando el cultivo para determinar el contenido nutricional de la planta o su producción. La extracción de nutrientes por las plantas representa en sí, el método más directo y concreto del análisis nutricional del suelo y se asume que, la composición química de la planta refleja en forma directa el estado nutricional del suelo. Sin embargo, se debe destacar que el análisis foliar es apenas una de las herramientas empleadas para determinar el mejor rendimiento de los cultivos y como tal debe complementar otros métodos y no reemplazarlos. Esta metodología, que está apoyada por numerosas investigaciones, se basa en que la cantidad y calidad de nutrición en planta puede determinarse analizando el contenido de nutrientes en las hojas. La técnica del análisis foliar es de mayor utilidad en los cultivos perennes que en los anuales debido a que estos últimos difícilmente podrían ser hechos con suficiente antelación como para realizar las correcciones pertinentes en el ciclo actual del cultivo, mientras que en plantas perennes como los árboles frutales, puede ser usado para corregir los problemas encontrados. Sin embargo, en la práctica, el diagnóstico foliar en cultivos perennes también tiene como inconveniente la fecha de muestreo. Así, Aldrich (1973) resumió el problema de interpretar el análisis foliar con una frase: “*plant analysis is usually postmortem*” y Bergmann (1992) indicó que una posible mejora en la calidad y cantidad de la producción por efecto de la fertilización durante la fase de crecimiento, solamente sería efectiva de aplicarse en el momento preciso.

El muestreo foliar de los manzanos, normalmente se realiza 75-105 días tras plena floración, que coincide con la segunda quincena de julio en el hemisferio

norte. En estas fechas, es muy difícil modificar el estatus nutricional o corregir los posibles desequilibrios nutricionales. Previamente investigaciones en melocotonero han permitido realizar el muestreo foliar 60 días tras plena floración (Sanz et al., 1991;1992) e incluso llevar a cabo un muestreo continuo durante toda la etapa de crecimiento (Sanz y Montañés, 1993). Otros investigadores han recomendado el uso de modelos matemáticos para avanzar la fecha de diagnóstico foliar en melocotonero (Leece y Gilmour, 1974), pero, aún así, el diagnóstico foliar, generalmente es muy tardío y su interpretación compleja debido a que la composición de las hojas está dinámicamente influenciada por procesos de envejecimiento, así como por las interacciones entre la planta y su entorno que afectan a la absorción y distribución de nutrientes (Wallworth y Summer, 1987).

Las flores son órganos con un periodo de vida corto, que están menos expuestas que las hojas y los frutos a los cambios metabólicos y a las prácticas culturales. Por lo tanto, de ser viable y considerando que el fruto es el resultado de la maduración del ovario de la flor, el análisis floral permitiría el diagnóstico temprano o prognosis de desórdenes nutricionales antes, incluso de que los síntomas fueran visibles.

En los últimos años, en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei, se han desarrollado una serie de técnicas basadas en el análisis floral con el objetivo de pronosticar la deficiencia de hierro en melocotonero y manzano (Sanz et al. 1995; Sanz et al. 1997; Sanz et al. 1998); para realizar el diagnóstico nutricional en cerezo, melocotonero y peral (Sanz et al. 1994; Sanz y Montañés 1995; Betran et al. 1997; Montañés Millán et al. 1997), e incluso se ha intentado relacionar la clorosis férrica con el bitter pit (Sanz y Machin 1999).

4.4.1. Diferenciación varietal

Dentro de una misma especie, la eficacia en la utilización de nutrientes varía entre líneas y cultivares (Marschner, 1995). En frutales, y más concretamente en manzano, se han descrito diferencias en los contenidos de nutrientes en hojas y frutos en función de la variedad (Marecelle, 1995; Sadowski et al., 1995), y también en la susceptibilidad al bitter-pit (Monge et al., 1995; Bergmann, 1993).

Al no disponer de información acerca de los contenidos minerales de las flores del manzano se pensó iniciar la caracterización nutricional de las mismas analizando las flores de cuatro variedades de manzano injertadas sobre M.9 pertenecientes a la colección de Aula Dei: Reineta, Verde Doncella, Red Delicious y Golden Smoothie.

Los datos han sido ordenados en dos grupos, separando los macro de los micronutrientes, y se ha realizado un análisis de varianza. En la *Tabla 15*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa que para todos los nutrientes, a excepción del fósforo, existen diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, por lo que se realizó un test de separación de medias (Test Duncan). El contenido mineral de la flor difiere entre variedades especialmente en el caso del calcio, cuya concentración varía para cada una de los cuatro cultivares analizados, encontrándose el valor mínimo en Golden Smoothie. En cuanto a los microelementos todos presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) y, al igual que ocurría con los macronutrientes, nuevamente la variedad Golden Smoothie, exceptuando el cobre, es la que presenta los valores más bajos especialmente para el Cinc.

Tabla 15: Composición nutricional de las flores de cuatro variedades distintas.

	Reineta	Verde Doncella	Red Delicious	Golden Smoothee
<i>Macronutrientes (% materia seca)</i>				
N	3,11 a	2,27 b	3,33 a	3,14 a
P	0,43 a	0,42 a	0,43 a	0,43 a
Ca	0,80 a	0,70 b	0,48 c	0,35 d
Mg	0,28 a	0,33 b	0,35 c	0,28 a
K	1,95 ab	2,18 c	2,05 bc	1,82 a
<i>Micronutrientes (ppm)</i>				
Fe	173,7 b	115,6 a	101,5 a	90,8 a
Mn	21,7 b	19,7 ab	25,2 c	17,5 a
Cu	63,6 b	58,8 b	29,5 a	31,2 a
Zn	41,3 c	26,0 a	35,6 b	6,3 c

Los valores en la misma fila seguidos de la misma letra no son significativamente distintos a $p \leq 0,05$ según el test de separación de medias de Duncan.

Estos resultados son interesantes, puesto que en la variedad Golden Smoothee del banco de germoplasma de manzano de la EEAD manifiesta todos los años distintos porcentajes de incidencia de bitter-pit, y en las otras tres variedades, según las observaciones del personal técnico del Departamento de Pomología, apenas se registran frutos con esta fisiopatía.

4.4.2. Estudio según el tipo de flor

En manzano las flores se agrupan en inflorescencias formadas por una flor central Reina (la primera en abrir) y las que le circundan que denominaremos No Reina para diferenciarlas de la anterior. Se realizó un análisis de ambos tipos de flor de la variedad Golden Smoothee en dos fincas distintas, una de las cuales es la referida “El Cerradico” de Quinto de Ebro y la otra, “San Miguel”, también del grupo ALM, ubicada en la localidad de Alfamén (40 km al sudoeste de la ciudad de Zaragoza).

Tabla 16: Composición nutricional de flores reina y no-reina en dos localidades.

	<i>Tipo flor</i>		Significación
	Reina	No Reina	
<hr/>			

<i>Macronutrientes (% materia seca)</i>			
N	3,28	2,71	***
P	0,46	0,43	***
K	1,77	1,82	n.s.
Ca	0,51	0,38	**
Mg	0,31	0,29	*
<i>Micronutrientes (ppm)</i>			
Fe	249,2	200,8	n.s.
Mn	26,2	22,8	*
Cu	45,1	44,4	n.s.
Zn	45,4	39,1	***
<i>Localización</i>			
	Quinto de Ebro	Alfamén	Significación
<i>Macronutrientes (% materia seca)</i>			
N	3,24	2,75	***
P	0,45	0,44	n.s.
K	1,98	1,61	***
Ca	0,44	0,46	n.s.
Mg	0,33	0,27	***
<i>Micronutrientes (ppm)</i>			
Fe	100,5	349,6	***
Mn	20,3	28,7	***
Cu	39,3	50,2	*
Zn	47,3	37,3	***

*** $P \leq 0,001$ altamente significativo; ** $P \leq 0,01$ muy significativo; * $P \leq 0,05$ significativo; n.s. no significativo.

El análisis de varianza del modelo experimental indica que no existe interacción entre el tipo de flor y su localización para un nivel de confianza del 95%, sin embargo, en los factores se encuentran diferencias significativas.

En la *Tabla 16; Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se observa que, según el tipo de flor, las concentraciones de nitrógeno y fósforo

varían muy significativamente, aunque en el caso del fósforo la diferencia entre las medias no es muy grande. El contenido en potasio, por unidad de peso seco, no difiere significativamente, pero la diferencia entre las medias de calcio y magnesio difieren para valores de $p \leq 0,01$ y $0,05$ respectivamente.

Entre los micronutrientes, hierro y cobre no presentan diferencias entre ambas clases de flor, en cambio manganeso y, especialmente, cinc difieren significativamente. El hierro es el microelemento mayoritario, siendo su concentración, al menos, un orden de magnitud mayor que el resto.

A pesar del dispar comportamiento que presentan los elementos, todos ellos están más concentrados, a excepción del potasio, en la flor reina. De los macronutrientes, el elemento mayoritario en las flores es el nitrógeno, seguido del potasio, mientras que los otros tres elementos presentan concentraciones similares pero siempre menores a los dos anteriores.

También se han encontrado diferencias significativas, según el ambiente de origen de las flores. Entre los macronutrientes, nitrógeno, potasio y magnesio presentan una significación muy alta que contrasta con calcio y fósforo a los que no les afecta la localización de la plantación. Para los microelementos, observamos que todos difieren significativamente, y destaca que el contenido de hierro en las flores muestreadas en Quinto de Ebro es mucho menor que el de las muestreadas en Alfamén.

4.4.3. Composición de las flores en distintos años

Se muestrearon durante dos años consecutivos flores de la variedad Golden Smoothie en una misma finca y se observó, a través del análisis de varianza, que los nutrientes: calcio, potasio magnesio, hierro, manganeso y cinc mostraban diferencias significativas de un año a otro para un nivel de confianza del 95%.

Los resultados de la *Tabla 17*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestran que nitrógeno y fósforo son los elementos menos sujetos a variaciones temporales y, en cambio, el calcio es el nutriente que presenta una mayor desviación entre los macroelementos. En otras leñosas, también se ha encontrado que, en tejido floral, nitrógeno y fósforo son los elementos menos sujetos a influencia medioambientales. Así, Sanz et al., (1995) al hacer una prospección en 100 parcelas de melocotonero, encontraron los menores coeficientes de variación para nitrógeno, fósforo y magnesio.

Tabla 17: Comparación del contenido de nutrientes en flor durante dos años consecutivos. Las medias aparecen seguidas del error típico

	1998	1999
<i>Macronutrientes (% materia seca)</i>		
N	3,14 ± 0,07	3,14 ± 0,05
P	0,40 ± 0,01	0,43 ± 0,00
Ca	0,54 ± 0,01	0,35 ± 0,01
Mg	0,23 ± 0,01	0,28 ± 0,00
K	2,20 ± 0,04	1,82 ± 0,07
<i>Micronutrientes (ppm)</i>		
Fe	139,3 ± 4,8	90,8 ± 4,9
Mn	26,6 ± 0,6	17,5 ± 0,9
Cu	26,6 ± 1,2	31,3 ± 1,8
Zn	37,0 ± 1,3	6,3 ± 0,8

4.4.4. Flor como punto de inicio en hoja y fruto

Hasta el momento solo se han descrito correlaciones entre los contenidos de nutrientes en flor con los correspondientes en hoja a los 60 días tras la plena floración (Sanz et al., 1995). Sin embargo, no se ha planteado relacionar los resultados del análisis floral con los de fruto y hoja. Así, en este apartado se pretende comprobar la adecuación del dato floral como punto de inicio de la evolución de nutrientes en hoja o en fruto. Cabe esperar que las mejores

relaciones se encuentren con el fruto ya que la flor es su origen, pero a este respecto no se han encontrado referencias bibliográficas que lo respalden.

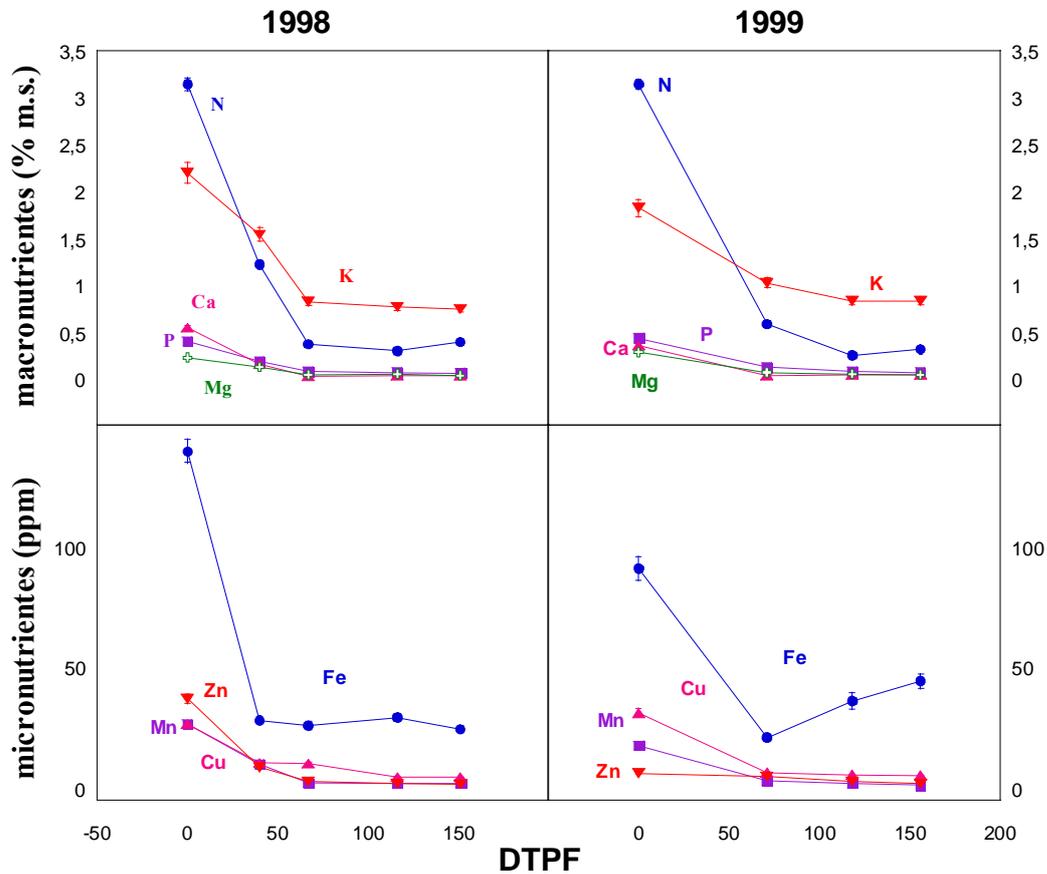


Figura 43: Evolución de macro y micronutrientes en fruto durante dos años consecutivos tomando como punto de inicio el dato de análisis floral

En la Figura 43; *Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se representa la evolución de los macro y micronutrientes, en fruto, durante dos años consecutivos (datos ya mostrados en apartados anteriores). La novedad de estas figuras consiste en que el punto inicial de cada serie evolutiva de datos es el correspondiente a la concentración en flor de cada nutriente. Se observa que, a principios de la estación, la flor contiene una concentración elevada de todos los

elementos y conforme el fruto va ganando peso esta se diluye. Según la forma de estas gráficas parece coherente considerar que la evolución de los macronutrientes sigue ecuaciones cinéticas logarítmicas o inverso de x .

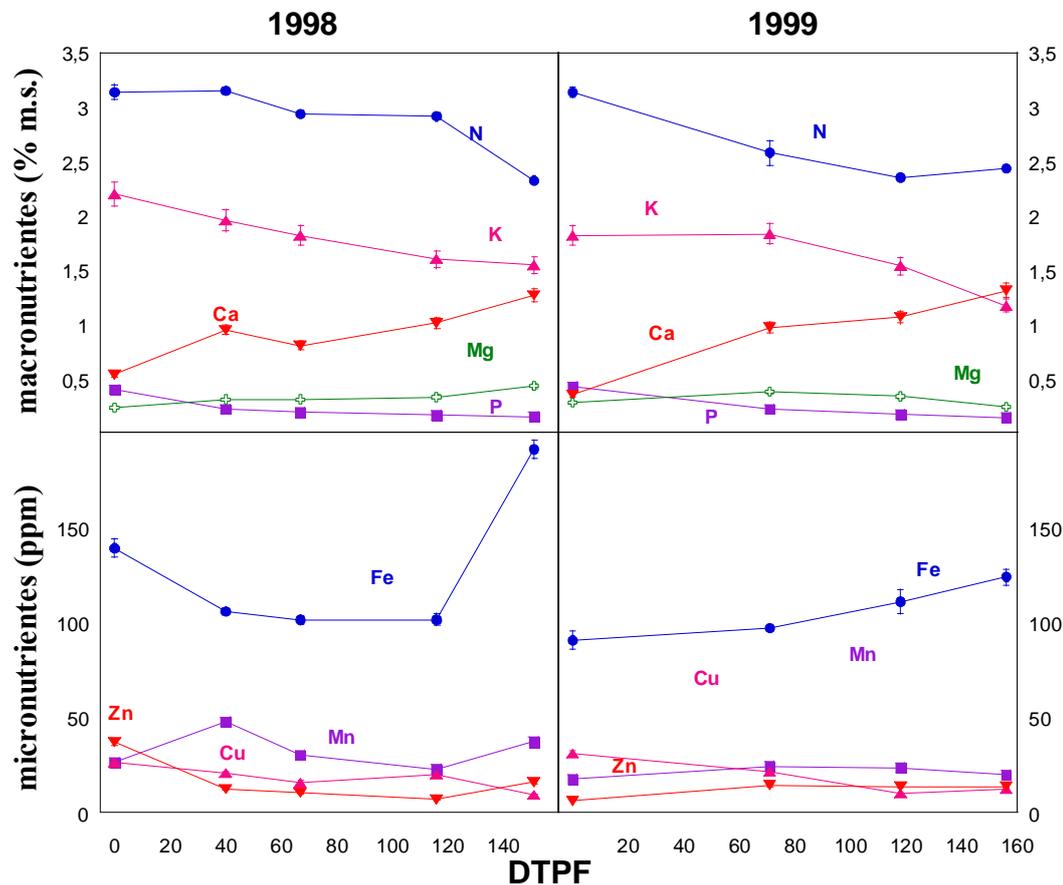


Figura 44: Evolución de macro y micronutrientes en hoja durante dos años consecutivos tomando como punto de inicio el dato de análisis floral

En la Figura 44; *Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se ha representado la evolución de los macro y micronutrientes en hoja durante dos años consecutivos tomando como primer punto de la evolución el análisis de nutrientes en flor. Se puede apreciar que todos los elementos analizados en flor se

encuentran en unos rangos similares a los encontrados en hoja, lo cual justifica los resultados encontrados por Sanz et al., (1995) para melocotonero.

4.4.5. Comparación de las pendientes de las rectas de tasa de acumulación con y sin flores.

En el apartado 4.3.3.5 de esta misma sección se definía la tasa de acumulación de fruto como la acumulación de un determinado nutriente en el fruto en función de su peso seco. En las *Figura 41*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** - *Figura 42*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observaba cómo el contenido de elementos minerales aumenta de forma lineal y significativa con el peso del mismo durante el periodo de crecimiento.

Para confirmar la coherencia de integrar los datos de flor en la evolución de los nutrientes en fruto, se recalcularon las tasas de acumulación incluyendo los datos de flor. La *Tabla 18*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra los valores de la pendientes así como de los coeficientes de regresión obtenidos en los correspondientes ajustes de regresión lineal.

Tabla 18: Comparación de las tasas de acumulación de nutrientes considerando o no los datos de flor.

	1998		1999	
	Sin dato flor	Con dato flor	Sin dato flor	Con dato flor
Macronutrientes (mg/fruto)				
N	1,85 (0,692**)	2,0 (0,798**)	2,34 (0,818**)	2,6 (0,685**)
P	0,58 (0,953**)	0,6 (0,957**)	0,56 (0,925**)	0,6 (0,946**)
K	7,09 (0,976**)	7,2 (0,976**)	8,15 (0,971**)	8,3 (0,973**)
Mg	0,35 (0,942**)	0,4 (0,959**)	0,33 (0,926**)	0,4 (0,923**)
Ca	0,26 (0,835**)	0,3 (0,862**)	0,47 (0,894**)	0,4 (0,821**)
Micronutrientes (µg/fruto)				
Fe	24,2 (0,823**)	24,3 (0,864**)	47,2 (0,912**)	44,4 (0,923**)
Mn	1,17 (0,750**)	1,25 (0,769**)	0,49 (0,457*)	0,82 (0,650**)
Cu	4,29 (0,774**)	4,41 (0,790**)	4,86 (0,954**)	5,04 (0,967**)

Zn	1,28 (0,855**)	1,34 (0,866**)	0,96 (767**)	1,41 (0,820**)
-----------	----------------	----------------	--------------	----------------

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). El valor entre paréntesis es el coeficiente de correlación de Pearson.

En ambos años se observa que, excepto en el caso del nitrógeno, la acumulación de macronutrientes calculada es ligeramente menor cuando se introduce el dato procedente del análisis floral, pero los coeficientes de regresión que se han obtenido son muy similares para ambos años y se mantiene el mismo orden de acumulación. Los valores obtenidos para los micronutrientes difieren menos que en el caso anterior.

En este apartado se ofrece una demostración adicional de la falta de consistencia de la teoría tradicional acerca de la asimilación de calcio por el fruto. En este caso solo se representan los promedios de concentración en fruto y de cantidad por fruto en cada una de las fechas de muestreo de 1998 (*Figura 45; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Se utilizan, como ejemplo, los datos de este año puesto que es la temporada de la que se dispone de mayor número de datos y, por tanto, más representativa. La sección izquierda de esta figura representa la evolución de los referidos parámetros en función de los días transcurridos tras la plena floración. En la parte superior se observa el brusco descenso de la concentración de calcio en fruto desde la flor hasta aproximadamente los 70 DTPF. A partir de este punto, continúa la pérdida de concentración pero a un ritmo mucho más moderado. Sin embargo, en la parte inferior se aprecia cómo la cantidad de calcio en fruto aumenta progresivamente. Es interesante advertir que la forma en S de esta figura rememora la típica sigmoidea de crecimiento de la masa del fruto (*Figura 26; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). En la parte derecha de la referida *Figura 45; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*, se expresan ambos parámetros en función del peso seco del fruto. En este caso el descenso brusco de concentración se produce desde la flor hasta el primer muestreo de frutos y el descenso posterior, aunque continuado es menos pronunciado. En la parte inferior,

la relación lineal que se apreció al trabajar con los datos brutos (*Figura 40; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*), se precisa aquí en una forma hiperbólica con una posible asíntota todavía alejada del rango representado en la gráfica.

Desde nuestro punto de vista, queda suficientemente demostrado que el calcio se acumula en el fruto con una tasa prácticamente constante a lo largo de su desarrollo. De esta forma se rebate la teoría tradicional expuesta en textos de nutrición vegetal (como ejemplo *vease* Bergman, 1992). El estudio detallado de la cinética de asimilación de calcio y otros nutrientes al fruto, merece una investigación más profunda.

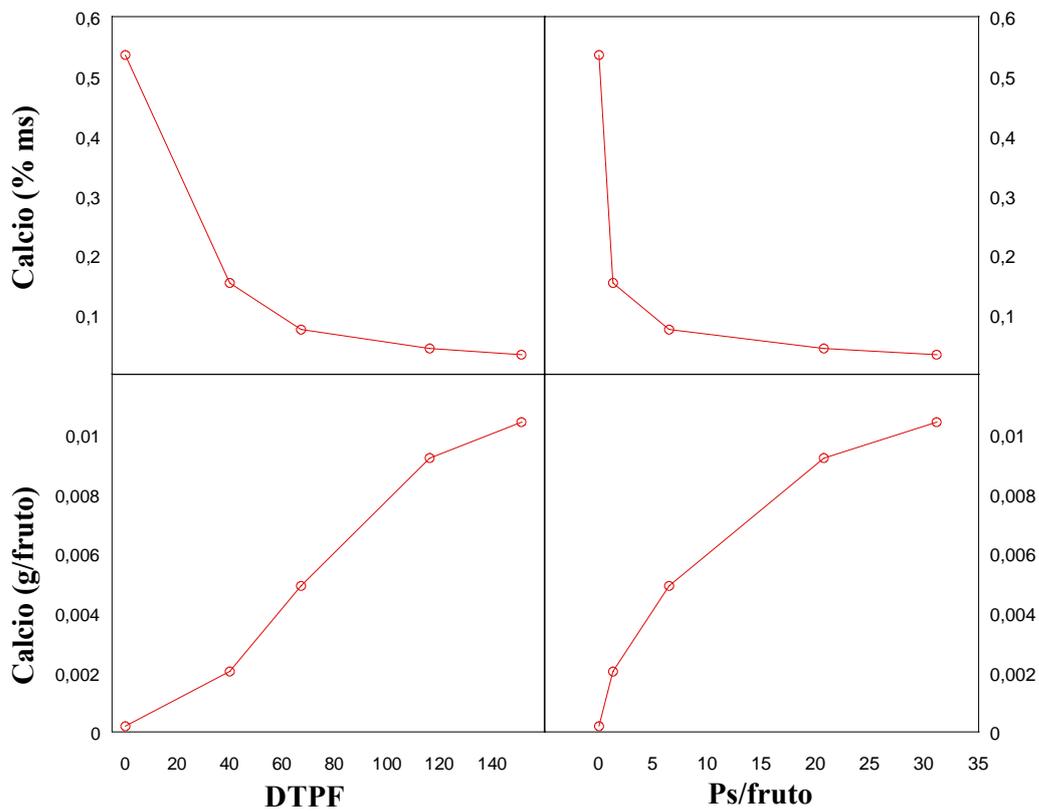


Figura 45. Evolución del contenido en calcio por unidad de peso seco (A) y por fruto (B), en función de los días tras la plena floración o del peso seco del fruto.

4.5. Detección visual de calcio en manzana

Mediante el método de *Detección precoz del Bitter-pit*, explicado con anterioridad en el apartado de Material y Métodos, que permite revelar de forma visual la distribución de calcio en superficies de fruto; se demostró que se produce una acumulación de dicho elemento en las áreas afectadas por la fisiopatía, tal y como se muestra en la *Figura 46*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** En estas imágenes se puede observar una coloración roja intensa, impresa en el papel de filtro, correspondiente a las zonas afectadas por bitter-pit, que aparece al realizar el corte en la manzana. En cambio, el tejido circundante a estas áreas, manifiesta una coloración menos intensa, que indica un menor contenido de calcio alrededor de las manchas.

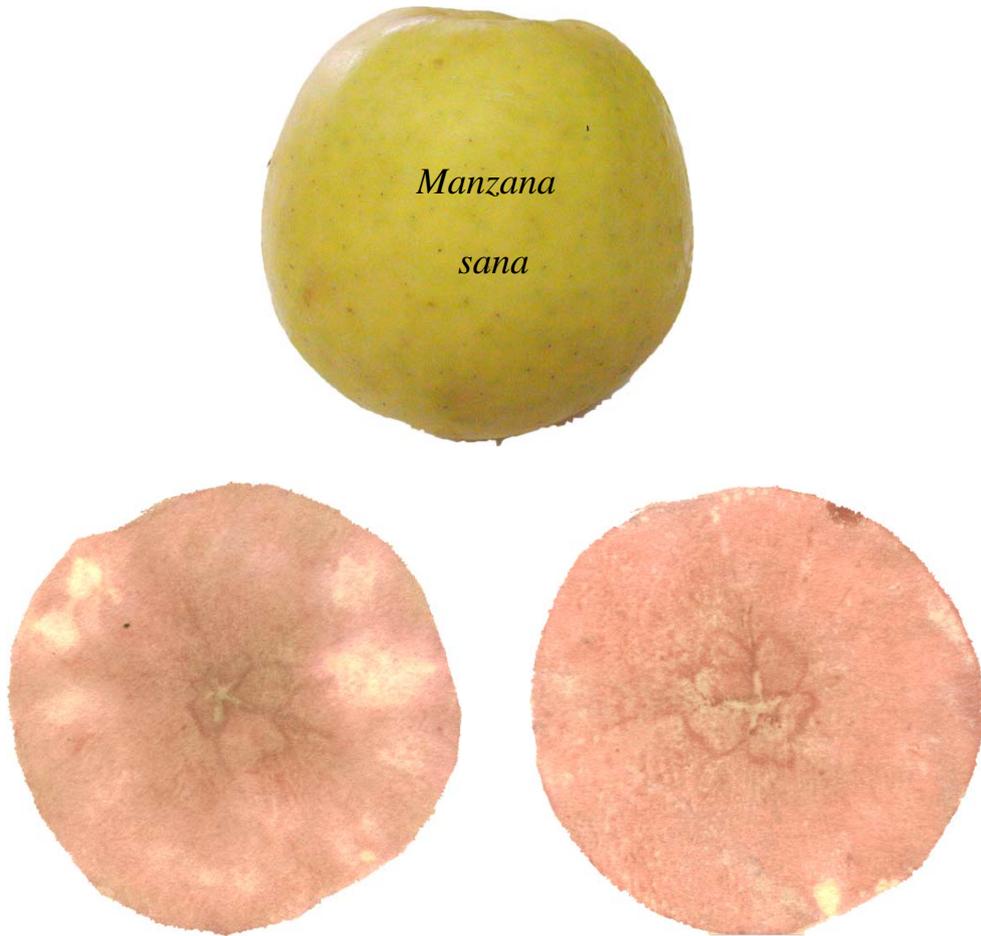
Si se comparan estos cortes con las tinciones realizadas en manzanas que no presentan ningún indicio de estar afectadas por la fisiopatía (*Figura 47*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), se pueden apreciar mayores cantidades de calcio en sus tejidos y una distribución más homogénea en toda la superficie de los cortes transversales y longitudinales.

Estos resultados discrepan de la teoría, generalmente aceptada, que propone que el bitter-pit es el resultado de una deficiencia localizada de calcio en el fruto (Wooldridge, 2000; Tomala, 1997, Ferguson, et al., 1989). La observación detallada de la *Figura 46*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y de la *Figura 47*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, abre una serie de cuestiones a las que se ha pretendido dar respuesta en el desarrollo del presente trabajo. En primer lugar sorprende que la pulpa del fruto afectado, efectivamente muestre una coloración más tenue que la del sano, excepto en la zona de las manchas. Esto indica que la deficiencia localizada de calcio en una zona del fruto no provoca la aparición del bitter-pit, sino que, aparentemente, se

produce el proceso contrario, las zonas afectadas extraen de su entorno todo el calcio posible y lo acumulan, en forma soluble o insoluble.



Figura 46: Tinción específica de calcio en distintas superficies de una manzana afectada por bitter-pit. En la parte superior se observa el aspecto externo del fruto y, en las inferiores, cortes transversales y longitudinal.



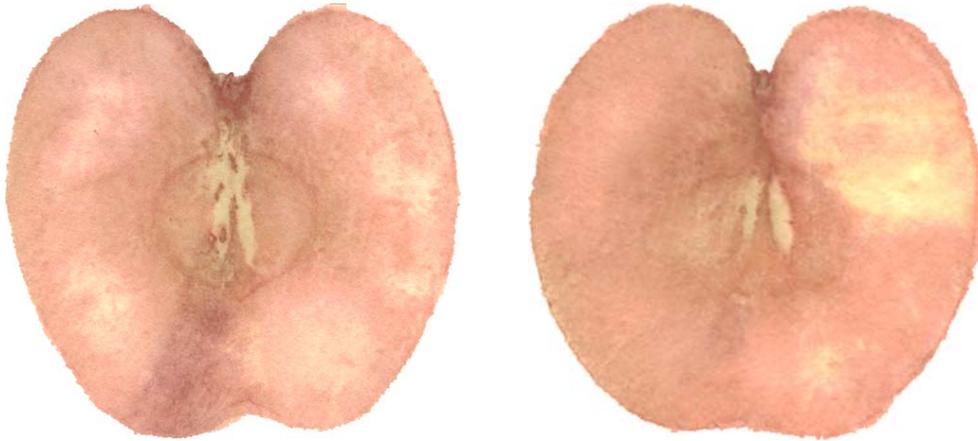


Figura 47: Tinción específica de calcio en distintas superficies de una manzana sana. En la parte superior se observa el aspecto externo del fruto y, en las inferiores, cortes transversales y longitudinales.

4.6. Caracterización química de las zonas afectadas por bitter-pit

Dentro de ciertos límites existe una proporción directa entre las concentraciones de un elemento en el suelo y en la savia de las plantas. Una planta bien nutrida deberá tener unos contenidos de elementos apropiados en sus tejidos, por otra parte, una planta deficiente en algún elemento, deberá tener al mismo en menor proporción (Valenzuela et al., 1993).

Las células vegetales están envueltas en una membrana plasmática que encierra una sustancia rica en agua llamada citoplasma, que engloba las estructuras especializadas y orgánulos, y comprende todo el volumen de la célula, salvo el núcleo. La savia y vacuola reflejan fielmente las condiciones metabólicas que existen en el momento de la toma de muestras y de hecho presentan variaciones importantes de composición química. Esta variabilidad no será un obstáculo si se separa la parte relativa a la absorción, de la parte relativa a la organización. Es evidente que un elemento absorbido en cantidad equivalente a las necesidades de la planta puede no estar presente en savia más que en formas de trazas, mientras otro que entra en la planta con un ritmo superior a su utilización, se acumulará en la vacuola. Esto hace difícil el estudio de las deficiencias en la

alimentación y pone en evidencia la deficiencia o exceso de cualquier elemento. La diferencia de composición química entre ellos, se debe también a las distintas condiciones de paso de los iones minerales a través de las paredes celulares (Marigo et al., 1968).

El estudio de los nutrientes solubles es antiguo (Oserkowky, 1932) pero dicha línea de interpretación continúa actualmente. El empleo del material seco permite el estudio de los nutrientes incluyendo el porcentaje que se acumula como reserva o en el que está vías de integración (transporte).

Diversos investigadores creen que los métodos analíticos usados con fracciones solubles son más fáciles de usar, principalmente porque se evita la conversión a cenizas del material vegetal. Habitualmente lo que se determina en el análisis de plantas es el contenido total de un nutriente por unidad de materia seca, es decir, digestión ácida o por vía seca. La determinación de una fracción del contenido, por ejemplo, la que es soluble en agua o en ácidos diluidos o agentes quelantes, a veces proporciona una indicación más precisa del estado nutricional de la planta. Esto ha sido demostrado para el Zn, donde la fracción soluble en agua refleja su estatus nutricional mejor que la total (Rahini y Schoropp, 1984).

Así pues, si se realiza una extracción con agua en muestras de manzana, se obtendrán dos fracciones, por una parte la fase soluble en la que permanecerán en solución los iones y moléculas citoplasmáticos, incluyendo el contenido de la vacuola; y por otra, la fase insoluble que contendrá los iones y compuestos unidos fuertemente a las estructuras celulares.

La electroforesis capilar es un método instrumental que permite el análisis de especies catiónicas y aniónicas en solución. La razón fundamental que nos ha llevado a utilizarla para el desarrollo de este trabajo ha sido la posibilidad de trabajar con pequeños volúmenes de solución, característica especialmente útil cuando la cantidad de muestra, por la dificultad de su obtención, es pequeña.

Además, los límites de detección que ofrece esta técnica son adecuados para realizar las determinaciones necesarias en este trabajo.

La identificación de las especies catiónicas y aniónicas se realizó por comparación de los tiempos de retención de patrones puros con los de los picos que aparecen en la muestra real. Posteriormente se elaboró un patrón complejo conteniendo todas las especies de interés para comprobar si el desplazamiento de compuestos a través de la columna electroforética se modificaba cuando existe más de una especie en solución. En efecto, se producían pequeñas modificaciones en los tiempos de migración cuando se trabajaba con patrones complejos. Para soslayar este inconveniente se procedió a la adición, en cada uno de los picos de la muestra real, una cantidad conocida del patrón correspondiente. De esta forma, se identificaron inequívocamente los compuestos aniónicos y los cationes presentes en la fase que resulta tras la extracción de los tejidos en agua (*Figura 48; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*).

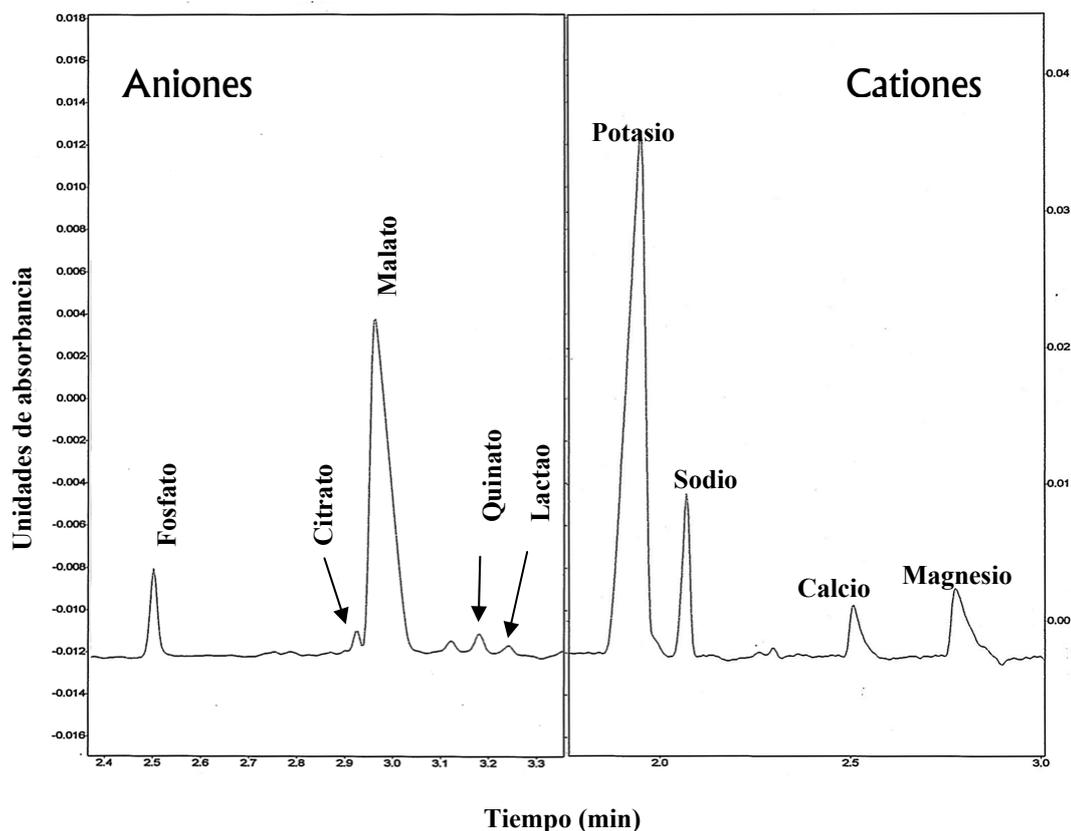


Figura 48: Electroferogramas de aniones y cationes en un extracto acuoso de manzana. En las gráficas se muestra la identificación de los elementos o moléculas mayoritarios.

Faust y Shear (1968) demostraron que algunos desordenes fisiológicos, como el bitter pit, están asociados con variaciones en el contenido de diversos elementos minerales. En este sentido Chamel y Bossy (1981) trabajando con distintas variedades de manzana y utilizando sonda de rayos-X en microscopía electrónica, concluyeron que el contenido en Mg^{2+} , Ca^{2+} y S^{2-} era significativamente mayor en los tejidos con bitter pit que en los sanos.

Se pretende determinar la composición de especies aniónicas como el fosfato y ácidos carboxílicos, y catiónicas en las zonas afectadas por bitter pit, comparando estos resultados con los obtenidos de zonas sanas de una manzana afectada y con tejidos de manzanas libres de la fisiopatía.

4.6.1. Composición aniónica

Se realizó un análisis por zonas de una manzana con bitter pit, separando quirúrgicamente las áreas afectadas. También se tomaron muestras de las partes sanas de esa misma manzana, y como referencia se analizó la pulpa de una manzana sin síntomas de la fisiopatía.

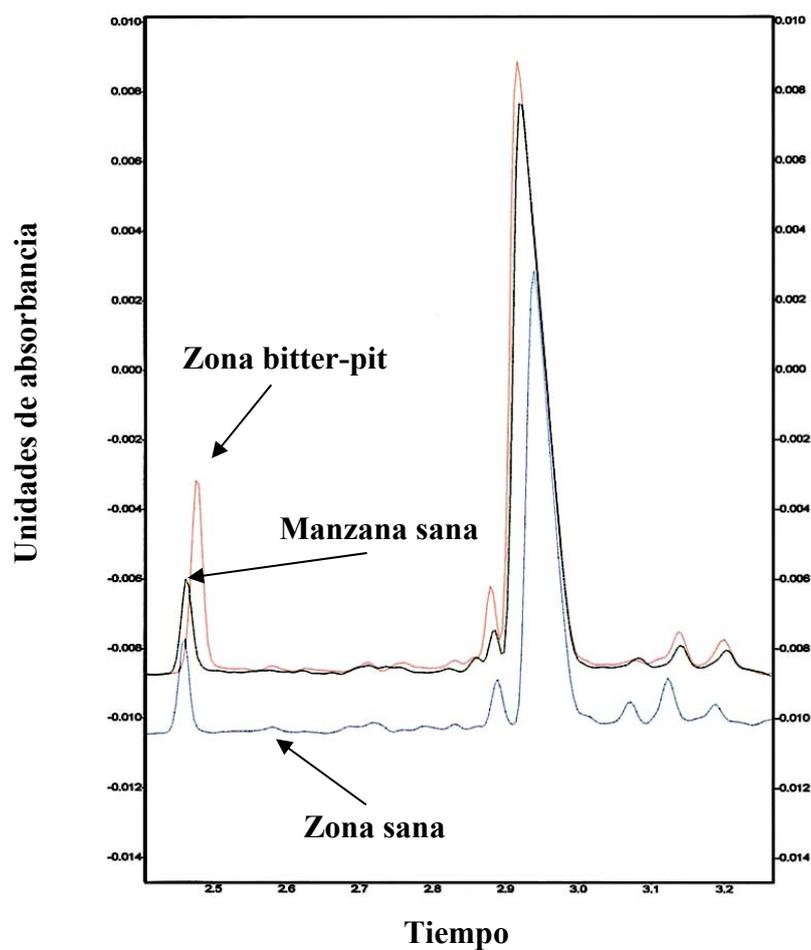


Figura 49: Electroferogramas de aniones de tres tipos de tejidos de manzana: bitter-pit, zona sana adyacente, y pulpa de manzanas sanas.

Tras la extracción en agua, como se describe en el apartado 3.4, se realizaron los correspondientes análisis por Electroforesis Capilar.

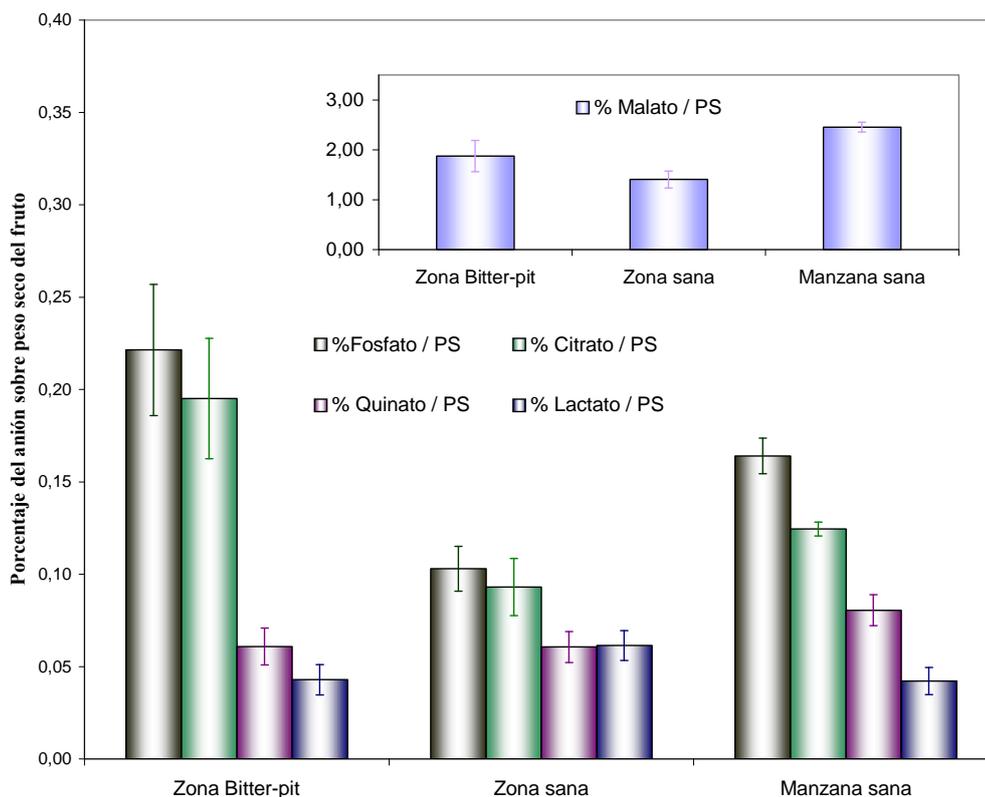


Figura 50: Composición aniónica de tres tipos de tejidos de manzana: bitter-pit, zona sana adyacente, y pulpa de manzanas sanas. Los datos son el promedio de 10 experimentos \pm el error típico.

En la *Figura 49* se muestran como ejemplo, los tres tipos de electroferogramas obtenidos. Del estudio inicial de estos resultados cabe destacar que en la zona de bitter pit de una manzana afectada se produce la acumulación de determinados aniones, en concreto, fosfato y citrato aumentan su concentración en el tejido afectado frente a la zona sana de esa misma manzana o al control. En efecto, en la *Figura 50*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se aprecia que el porcentaje de estos dos aniones, en base a peso seco, es aproximadamente el doble en la zona afectada, que en la sana adyacente, mientras que en la manzana sana se alcanzan valores intermedios entre los dos extremos.

La concentración de los ácidos quínico y láctico, es similar en los tres tipos de tejidos. El ácido málico, anión mayoritario en las manzanas, disminuye su concentración en la zona sana de la manzana afectada para aumentar en la zona de bitter pit y en el control. En estos dos últimos casos, los valores son similares. Según Bangerth (1979), los ácidos oxálico y cítrico eliminan de forma activa el calcio de las células de membrana y pared; bien por precipitación formando cristales de oxalato, o bien por quelación formando citratos. Además Steenkamp y Terblanche (1983) mantienen que, si el calcio se encuentra presente en suficiente cantidad, puede neutralizar estos dos ácidos orgánicos, desempeñando un papel protector en las células. Los resultados obtenidos están de acuerdo por los descritos por Steenkamp y Terblanche (1983). Sin embargo, en nuestro caso, no se han encontrado evidencias de la existencia de oxalato en fruto, incluso tras haber realizado extracciones con los medios que utilizan estos autores (ácido acético y HCl diluido).

4.6.2. Composición catiónica

Como en el caso de los aniones, en la *Figura 51*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se representan los electroferogramas de cationes en los tres tipos de tejidos mencionados en el apartado anterior.

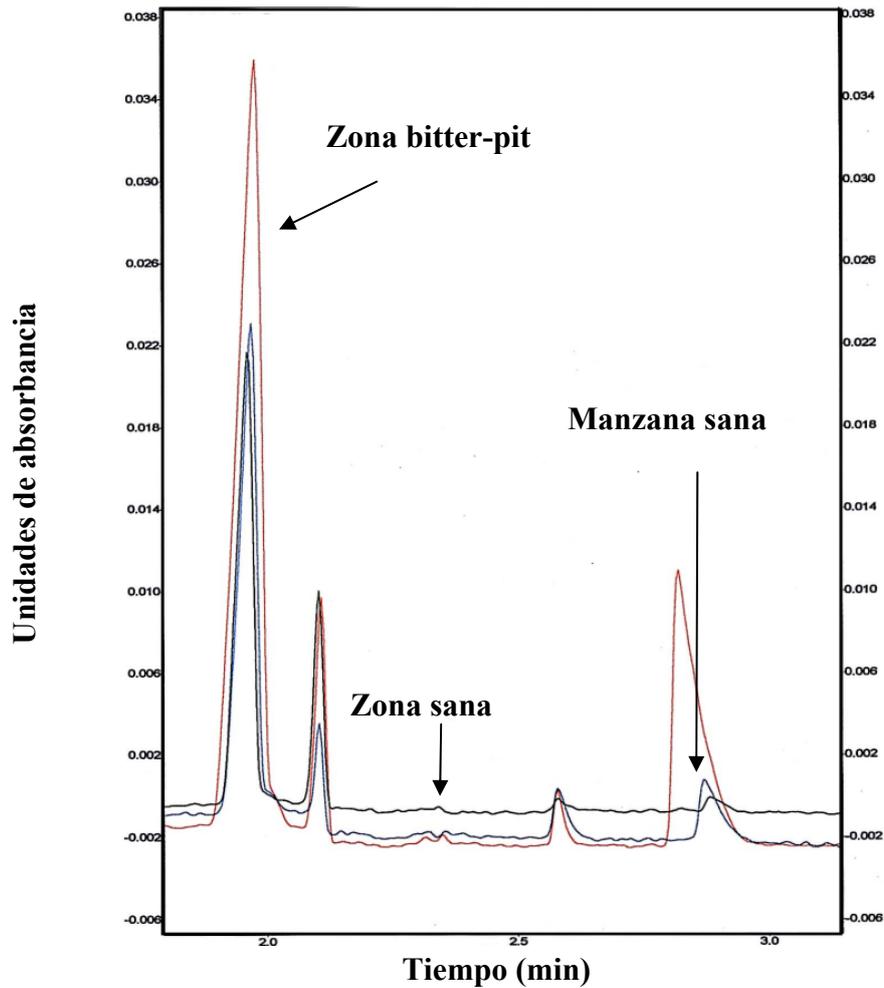


Figura 51: Electroferogramas de cationes de tres tejidos de manzana: bitter-pit, zona sana adyacente, y pulpa de manzanas sanas.

En la *Figura 52*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa que la concentración de calcio hidrosoluble es ligeramente mayor en las zonas de bitter pit de manzanas afectadas que en la zona sana de la misma manzana y que en una sana.

En la misma figura, se aprecia que potasio y magnesio presentan el mismo comportamiento que el calcio, acumulándose mayoritariamente en la zona de

bitter pit. Cabe destacar que la concentración de Mg^{2+} en la zona de bitter-pit se acumula en una concentración 7 veces mayor a la que se encuentra en la zona adyacente o en una manzana sana.

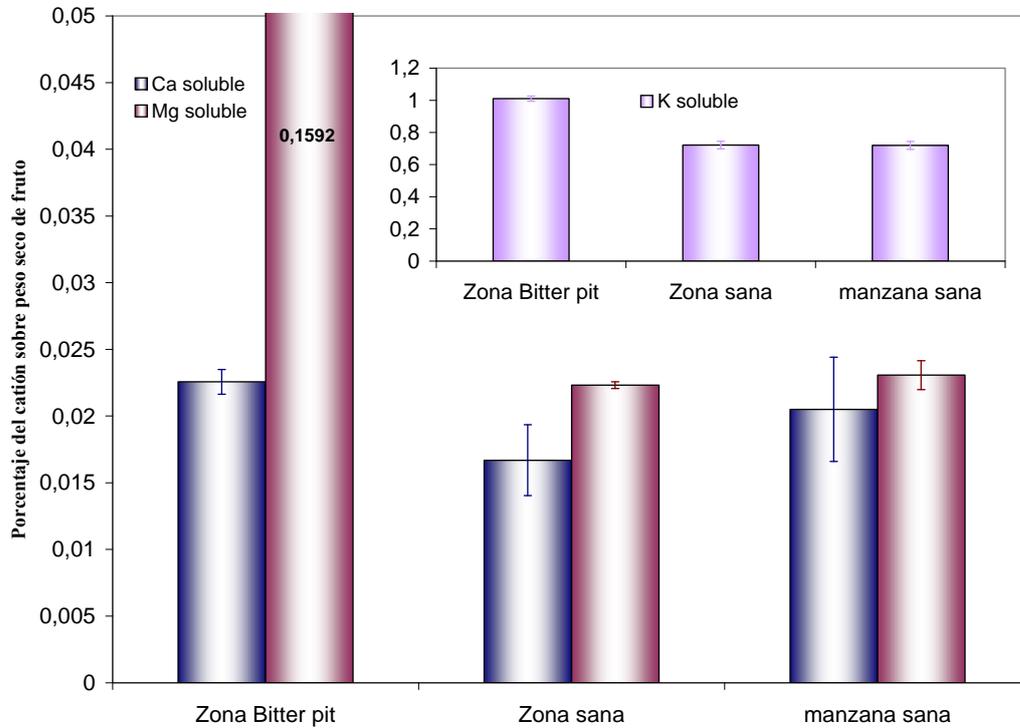


Figura 52: Composición en Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} solubles en agua, de tres tejidos de manzana: bitter-pit, zona sana adyacente, y pulpa de manzanas sanas. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes \pm error típico.

La **Figura 53**; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** representa el contenido insoluble en agua de los tres cationes, cabe destacar la diferencia respecto al contenido soluble. En primer lugar se observa el comportamiento inverso existente entre calcio y magnesio no soluble, en especial, en la zona afectada por bitter pit. Sin embargo, el potasio sigue la misma tendencia que en la figura anterior acumulándose en la zona afectada por bitter pit.

Según Steenkamp y Terblanche (1983) la mayoría del calcio en las manzanas se encuentra en forma insoluble tanto en el tejido sano como en el de bitter pit, concretamente el 69,7% en las zonas afectadas y el 57,9% en las sanas. En cuanto al contenido en potasio y magnesio ocurre lo contrario, en ambos tejidos, es mayor la parte soluble en agua que la insoluble. Los resultados representados en la figura siguen un comportamiento similar al descrito por los autores anteriormente citados.

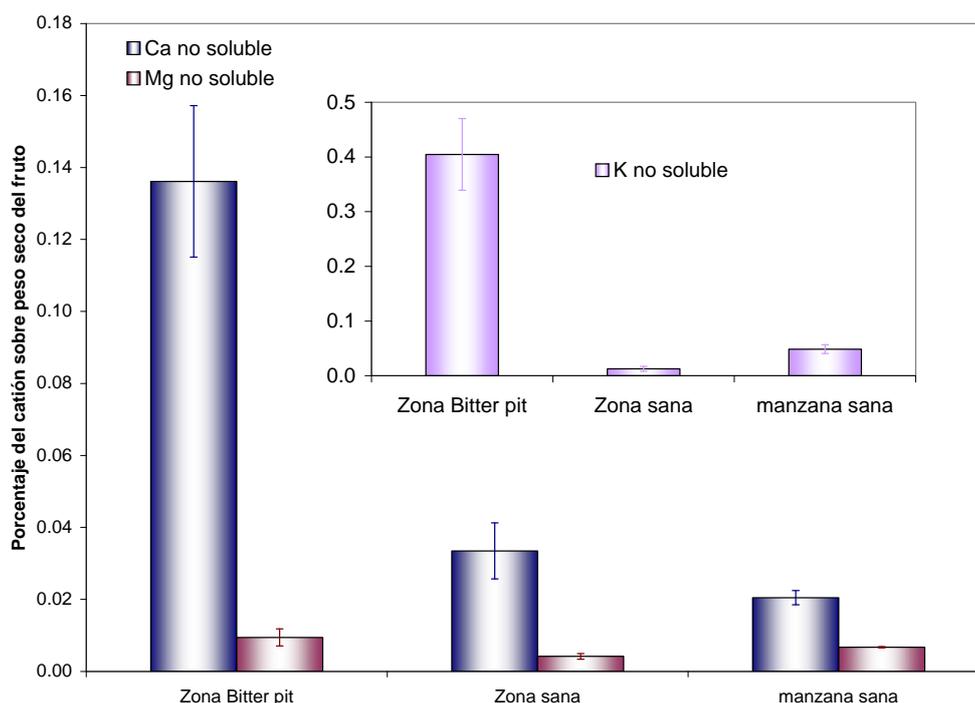


Figura 53: Composición en Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} insolubles en agua, de tres tejidos de manzana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes \pm error típico.

Atendiendo a la contribución global del calcio (*Figura 54; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*) se observa una diferencia en la forma predominante en los distintos tejidos. Así en la zona afectada por bitter pit predomina el calcio insoluble, al igual que ocurre en la zona sana de esa misma manzana. En cambio, en el fruto sano la proporción entre las formas solubles e

insolubles están equilibradas. Considerando los valores absolutos de calcio soluble e insoluble en los tres tejidos (*Figura 52 - Figura 53*), es de destacar que la suma de las dos fracciones, tanto en la manzana sana como en el tejido adyacente, no excede a la encontrada en el tejido afectado. Esto indica que la baja concentración de calcio en fruto, *per se*, no desencadena la patología.

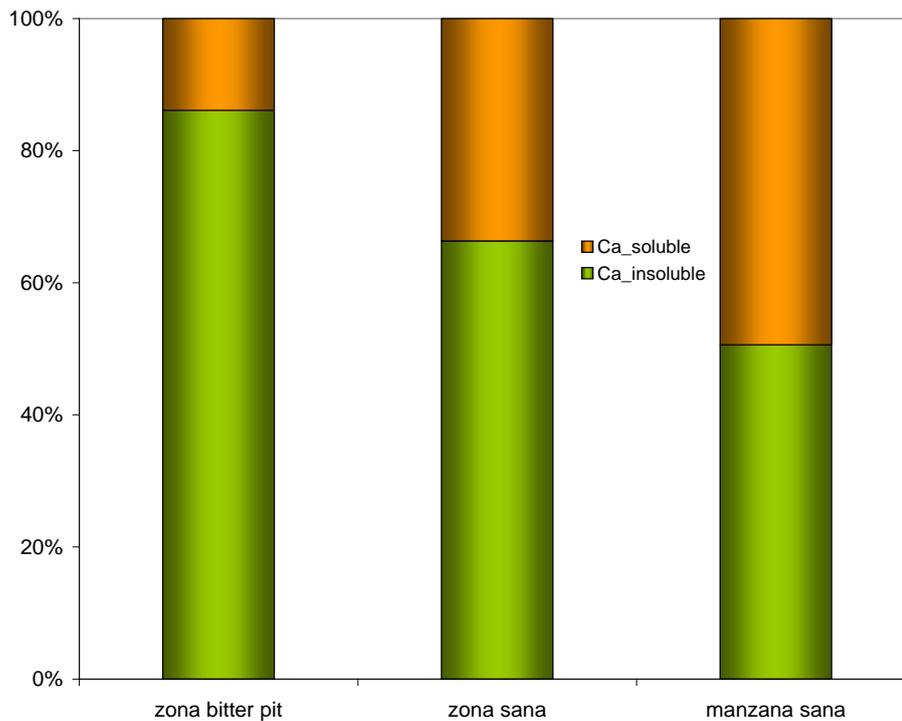


Figura 54: Contribución de cada una de las dos formas de Ca^{2+} (soluble e insoluble) al total de su concentración en los tres tejidos.

Asímismo, si consideramos la aportación global de los cationes, en las manchas de bitter pit no sólo se acumula mayor concentración de calcio sino también de magnesio. De hecho el magnesio total encontrado en las lesiones es casi 7 veces mayor que el del tejido circundante y el de la manzana sana. La contribución de la fase soluble al Mg^{2+} total supone 94-84% en ambos tejidos del fruto afectado, mientras que en el fruto sano disminuiría hasta un 77% (*Figura*

55; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En este mismo sentido Chamel y Bossi (1981), encontraron mayores concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} en las zonas de bitter pit y Burmeister y Dilley (1993) dan cuenta de una interrelación entre concentraciones bajas de Ca^{2+} y altas de Mg^{2+} en manzanas con bitter pit. Como teoría podría apuntarse que el incremento de Mg^{2+} alteraría la delicada homeostasis del Ca^{2+} . También se ha sugerido que la actividad de la polifenoloxidasas, responsable del oscurecimiento de las lesiones por bitter pit, se potencia en presencia de sales de Mg^{2+} (Hopfinger et al., 1984). En cualquier caso, estos resultados justificarían los obtenidos por Retamales et al., (2000) que consiguen inducir la aparición de manchas similares al bitter pit infiltrando MgCl_2 .

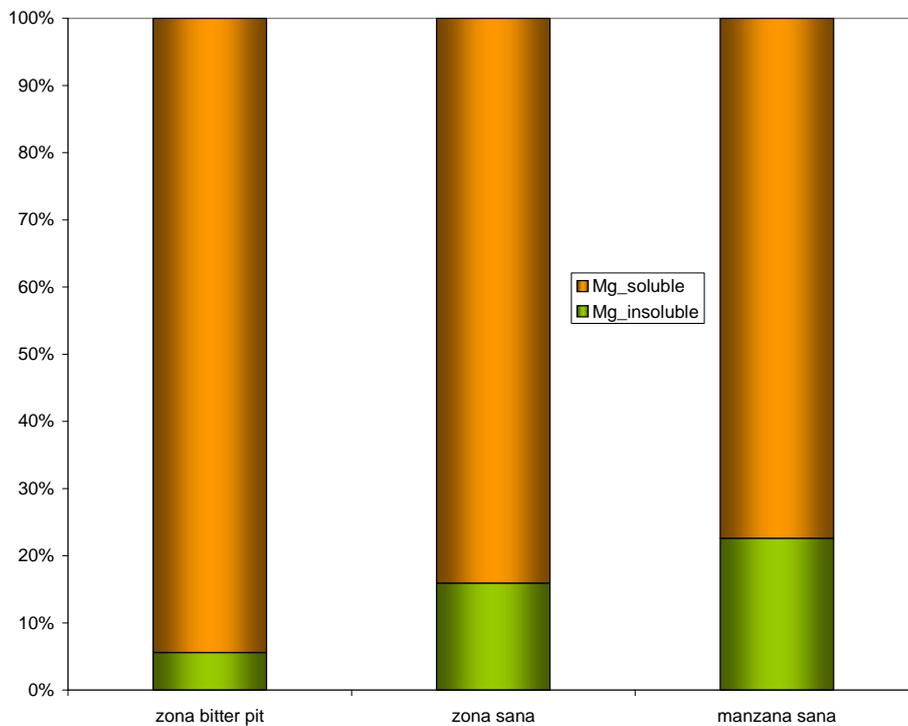


Figura 55: Contribución de cada una de las dos formas de Mg^{2+} (soluble e insoluble) al total de su concentración en los tres tejidos.

En cuanto al potasio, atendiendo a su contribución global, cabe destacar que en la zona afectada la forma insoluble constituye el 29% frente al 2-6% del resto, aunque el potasio soluble es el elemento mayoritario en todos los tejidos analizados (*Figura 56; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Este dato no es de extrañar, teniendo en cuenta que dicho catión es el más abundante en el citoplasma contribuyendo al mantenimiento del potencial osmótico de las células (Marschner, 1995). La elevada presencia de potasio en la zona afectada por bitter pit (soluble e insoluble) podría deberse a la necesidad de neutralizar aniones, como fosfato y citrato que también se acumulan en dicha zona (*Figura 50; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*).

En contraste con el Mg^{2+} y el Ca^{2+} , que tienen importantes funciones estructurales, limitadas únicamente por su movilidad; el K^+ actúa, principalmente, como un transportador de cargas de alta movilidad que únicamente forma complejos débiles (Wyn-Jones, 1979). Las altas concentraciones de K^+ en el citoplasma son necesarias para neutralizar los aniones disueltos (aniones de ácidos orgánicos e inorgánicos) y los insolubles y, además, para estabilizar el pH entre 7-8, óptimo para la mayoría de las reacciones enzimáticas.

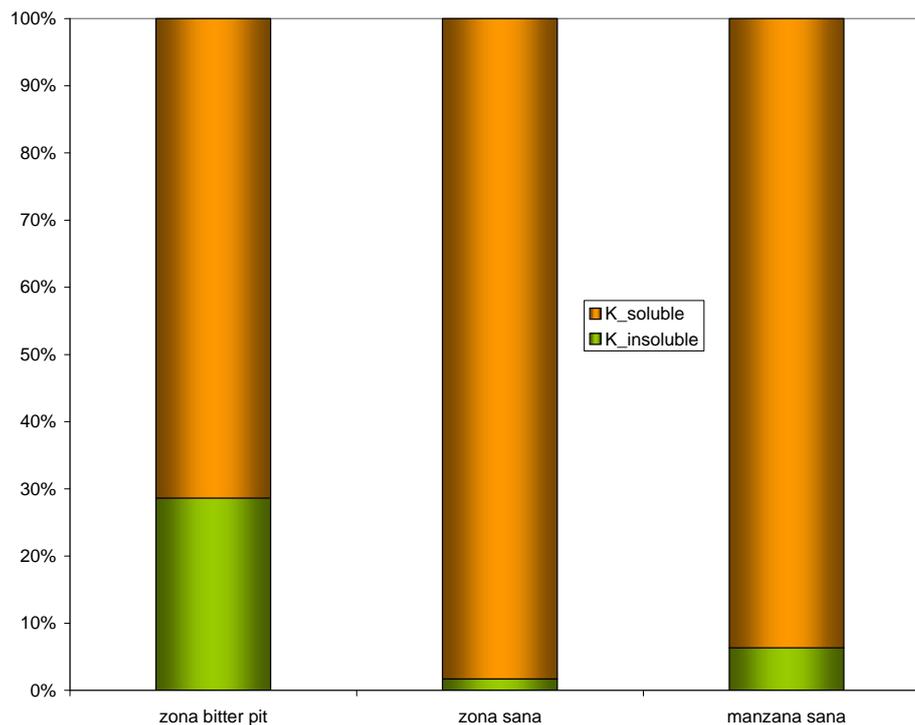


Figura 56: Contribución de cada una de las dos formas de K^+ (soluble e insoluble) al total de su concentración en los tres tejidos.

4.7. Caracterización química de distintas partes de una manzana

La hoja es el órgano principal de la planta desde el punto de vista metabólico y, por tanto, debe reflejar el estado nutricional de la misma; sin embargo, en ciertos casos, se han analizado tejidos y órganos distintos a las hojas. Martín-Prevel, et al., (1987), recoge los resultados de otros autores concernientes al análisis de brotes terminales, peciolo, tallos, frutos y raíces. En el caso del manzano como se ha referido repetidamente a lo largo de este trabajo, el análisis de fruto es una herramienta imprescindible para conocer el estatus nutricional de la planta (apartado 4.1.1), pero generalmente, en la mayoría de estos análisis se excluyen ciertas partes del mismo como semillas, pedúnculos y en menor medida la piel. Desde los años 50 se ha descrito que la concentración de nutrientes en la piel es mayor que en la pulpa (Mason, 1953; citado por Wilkinson y Perring,

1964), y más recientemente Raese y Drake (1997 y 2000) han obtenido interesante información acerca de la composición mineral de la piel de manzanas Fuji, Granny Smith y Red y Golden Delicious en estudios orientados a verificar la efectividad de tratamientos con nitrógeno y aspersiones con calcio.

Desde nuestro punto de vista, creemos interesante el estudio de piel, pedúnculo, semillas y pulpa de manzana para elaborar un mapa de la distribución de nutrientes en el fruto sano o en el afectado por bitter-pit y, también para profundizar en los procesos de transporte de dichos nutrientes.

4.7.1. Análisis de epidermis

La epidermis está revestida por una película de cera llamada cutícula; es impermeable, y su función es reducir la pérdida de agua por evaporación a través de la superficie de la planta. La cutinización es una transformación de la pared celular de las células epidérmicas que suele ir acompañada de un complejo de secreciones muy variable. La cutina es sumamente impermeable al agua por su naturaleza lipófila y, además, cumple con funciones mecánicas, exhibiendo una aceptable permeabilidad a los gases. Además, aún se depositan nuevos materiales que impregnan todo el conjunto, como ceras e hidrocarburos que refuerzan todavía más la impermeabilidad. Las propiedades de la superficie del fruto, especialmente, las de la cutícula, condicionan la absorción y distribución de los posibles tratamientos aplicados en aspersión (Roy et al., 1999).

En nuestro experimento, también se dividió el material de la epidermis en dos partes calcínea y peduncular, y de estas se tomaron muestras de epicarpio sano y afectado por bitter-pit.

La primera diferencia notable que pudo registrarse tuvo que ver con el porcentaje de humedad contenida en estos tejidos (*Tabla 19; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Tanto la piel del tejido sano como la del afectado contienen prácticamente el mismo porcentaje de agua

independientemente de la zona de muestreo. Sin embargo, la afectada por bitter-pit contiene 2-3% más de humedad que la piel sana. Esto indica que posiblemente la piel afectada haya perdido parte de su impermeabilidad, perdiendo así características de protección frente a las agresiones externas.

Tabla 19. Humedad contenida en la piel peduncular y calicina de las zonas sanas y afectadas por bitter pit

<i>Tejido</i>	<i>Parte</i>	<i>Porcentaje de humedad</i>	
		Calicina	Peduncular
Sano		78,24±0,07	78,61±0,05
Bitter-pit		81,31±0,02	81,78±0,03

4.7.1.1. Composición aniónica

Como puede observarse en la *Figura 57*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, en ambos tipos de manzanas, la piel correspondiente a la zona calicina del fruto presenta mayor contenido en fosfato, estando más concentrado en el sano, al igual que en la piel de la zona peduncular donde la concentración de este anión es mayor en la manzana sana que en la afectada. La concentración, tanto de citrato como de malato, no dependen de la zona de piel analizada, ni de si el fruto está o no afectado por el bitter pit. En cuanto al ácido quínico, a excepción de la piel peduncular de una manzana sana, se encuentra homogéneamente distribuido. El último de los ácidos analizados, el ácido láctico está más presente

en la manzana sana que en la afectada y algo más concentrado en la zona peduncular que en la cálicina.

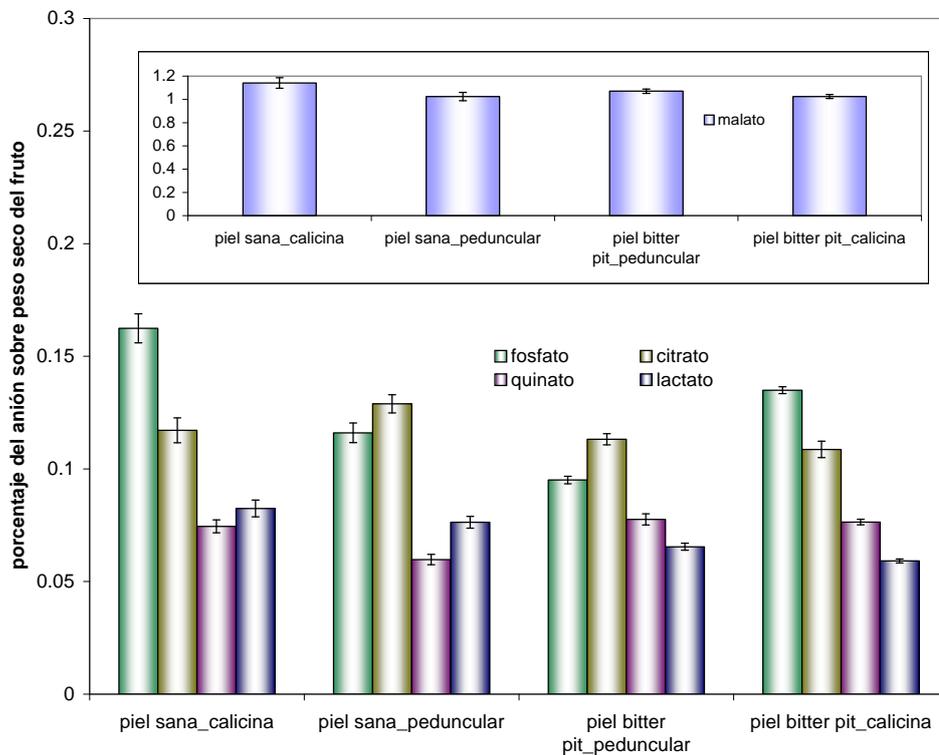


Figura 57: Composición aniónica de distintas zonas de piel de manzana: bitter pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos. La barra de error corresponde al error típico.

4.7.1.2. Composición catiónica

La **Figura 58;Error! No se encuentra el origen de la referencia.** revela que la distribución de cationes solubles en agua, en la piel de una manzana, no es uniforme. Se han analizado dos zonas opuestas de manzanas sanas y de afectadas por bitter pit. Los resultados muestran que el calcio se encuentra en mayor concentración en la piel de la manzana sana que en la de la afectada, encontrándose la menor concentración de este elemento en la piel cálicina de la manzana afectada. En cuanto al magnesio la situación se invierte, destacando la mayor concentración en la piel de una manzana afectada, especialmente en la

parte cálcica del fruto. Por último, para el potasio no se observan variaciones importantes, ni atendiendo a la localización del tejido ni a su estado sanitario.

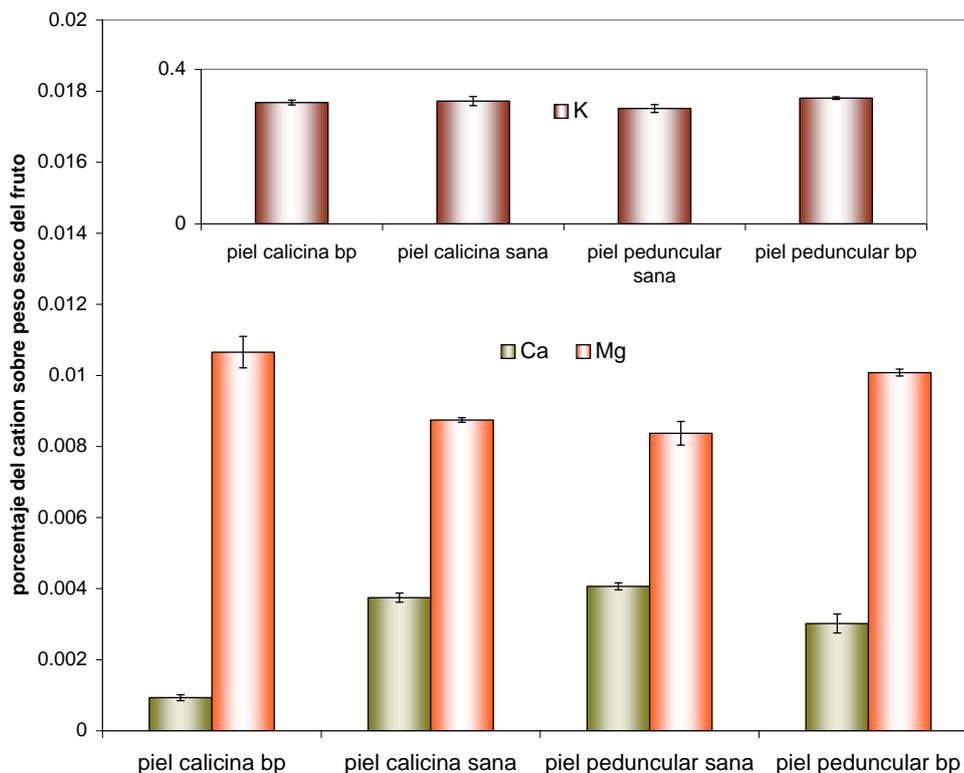


Figura 58: Composición en Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} solubles en agua, de distintas zonas de piel de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde al error típico.

En cuanto al análisis de la fracción insoluble, en la *Figura 59*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observan rangos de concentración mayores para los tres cationes que los mostrados en el gráfico de la fracción soluble. En primer lugar, la piel de una manzana sana presenta mayores concentraciones de calcio no soluble que la de una manzana afectada por bitter pit. Los valores encontrados en la zona cálcica de la piel son ligeramente superiores a los correspondientes de la zona peduncular, en ambos tipos de manzanas. En referencia al magnesio, su presencia en la zona cálcica de las dos manzanas es similar, mientras que en la piel peduncular de la manzana afectada la

concentración de magnesio es superior incluso a la de la calicina. El potasio en la manzana sana no presenta una variación significativa entre las dos zonas de piel analizadas, en cambio, en la manzana afectada, se observa una cierta acumulación en la piel peduncular, al igual que ocurría con el magnesio.

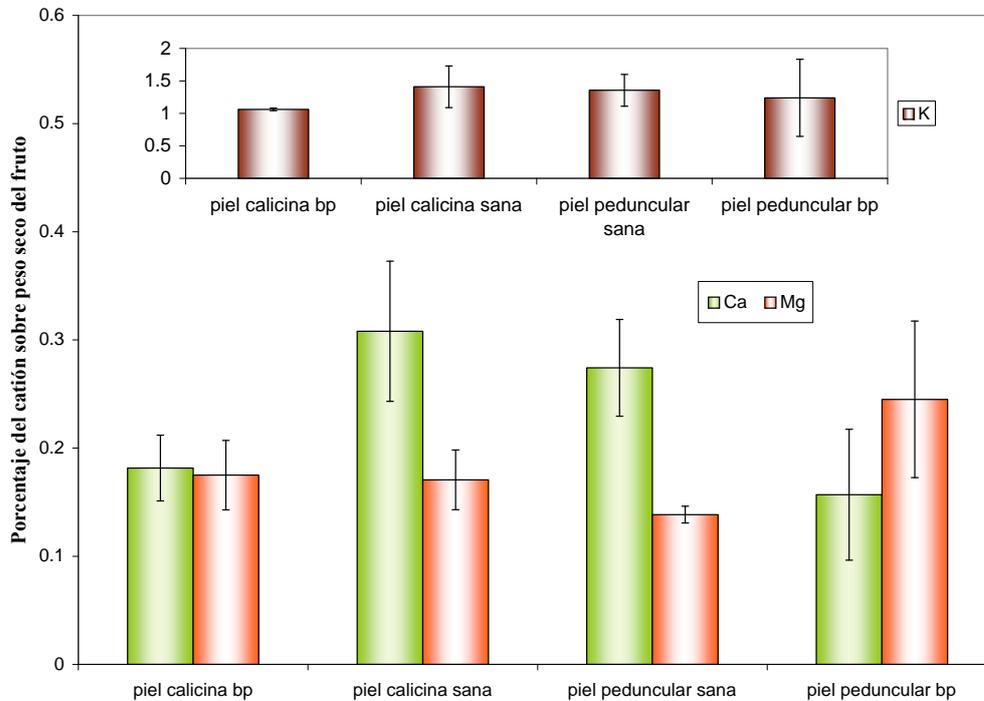


Figura 59: Composición en Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ insolubles en agua, de distintas zonas de piel de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde al error típico.

Al comparar los análisis de la piel con los de las zonas de pulpa, afectadas o no por bitter pit (*Figura 52; Error! No se encuentra el origen de la referencia.* y *Figura 53; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*), se observa que los mayores valores de concentración en la pulpa del fruto se encuentran en la forma soluble. Sin embargo, en la piel se produce el fenómeno inverso, la presencia de estos cationes es mayoritaria en la fase insoluble. Estos datos indican que en el tejido afectado por bitter-pit se producen modificaciones en su composición mineral que posiblemente se asocien con las roturas y

discontinuidades observadas por Roy et al., (1999) en la estructura epicuticular tras varios meses de almacenamiento.

4.7.2. Análisis de semillas

Algunos autores, como Cutting et al., 1990 y Broom et al., 1998, afirman que es necesario asegurar una buena polinización para obtener un número de semillas alto, y así prevenir posibles alteraciones fisiológicas. Asimismo, sugieren que existe un efecto positivo del número de semillas y una baja incidencia de bitter-pit. Estos datos apoyan la idea de una interdependencia entre el transporte basípeto de auxinas y el acrópeto de calcio que determinan, en parte, la cantidad de calcio que recibe el fruto. Cortés (2000) comprobó la veracidad de esta hipótesis realizando un recuento de semillas en dos poblaciones de manzanas, una afectada por bitter-pit y otra sana, observando que el número medio de semillas en las afectadas era 2,3 veces menor que en sanas.

Existe muy poca información sobre la composición nutricional de las semillas de manzana, por lo que se realizaron análisis diferenciando entre pepitas que proceden de manzanas afectadas y de manzanas sanas.

4.7.2.1. Composición aniónica

La *Figura 60* muestra que existe poca diferencia entre el contenido aniónico de manzanas sanas y afectadas por bitter pit. Destacar que el fosfato está presente en mayor cantidad en una manzana sana, y el restos de aniones están ligeramente más concentrados en las pepitas de la afectada por bitter pit.

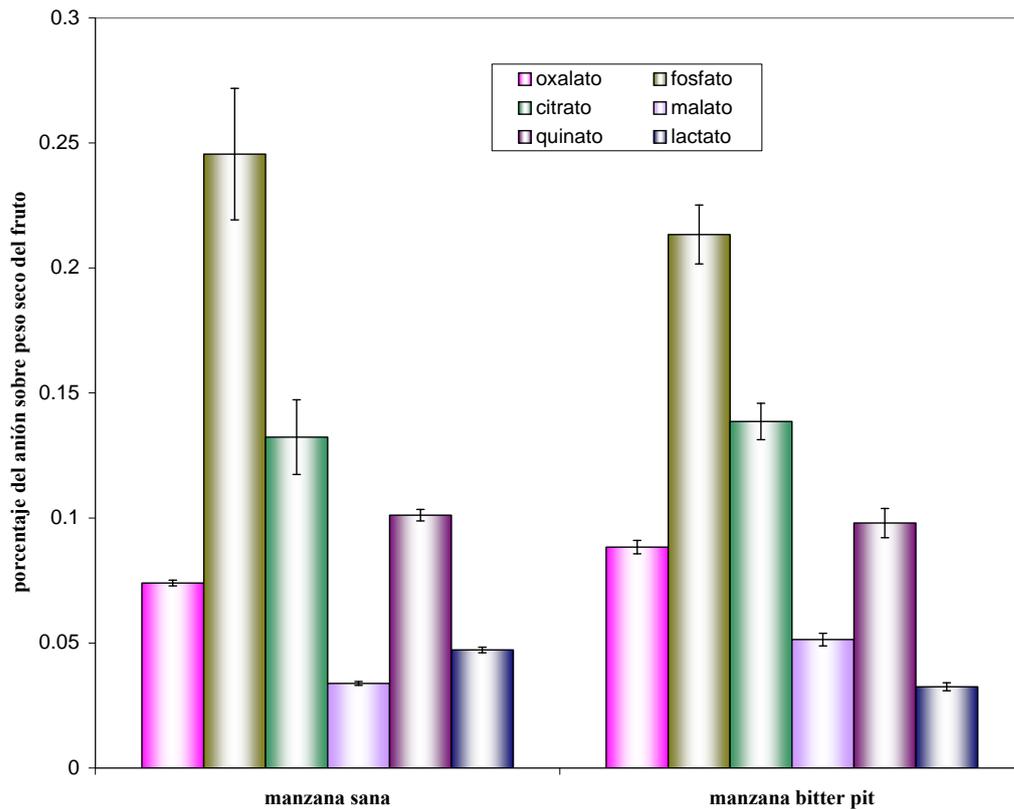


Figura 60: Composición aniónica de semillas de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica.

4.7.2.2. Composición catiónica

Al igual que lo observado en el análisis de piel, en la fase insoluble de las semillas, los cationes están más concentrados que en la soluble. En ambos tipos de manzanas se observa (*Figura 61*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) que existe una distribución similar en cuanto a la fase soluble se refiere. En la fase insoluble (*Figura 62*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) las semillas de una manzana sana presentan los cationes más concentrados que las de una manzana afectada por bitter pit.

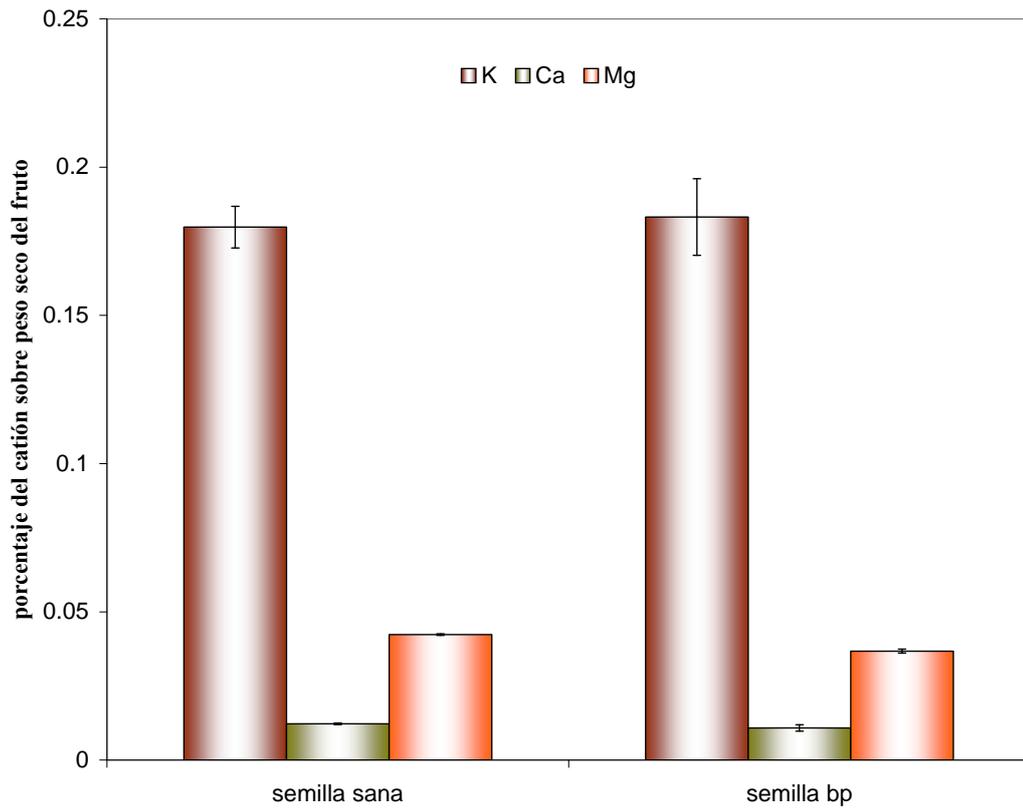


Figura 61: Composición en Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ solubles en agua, de semillas de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica

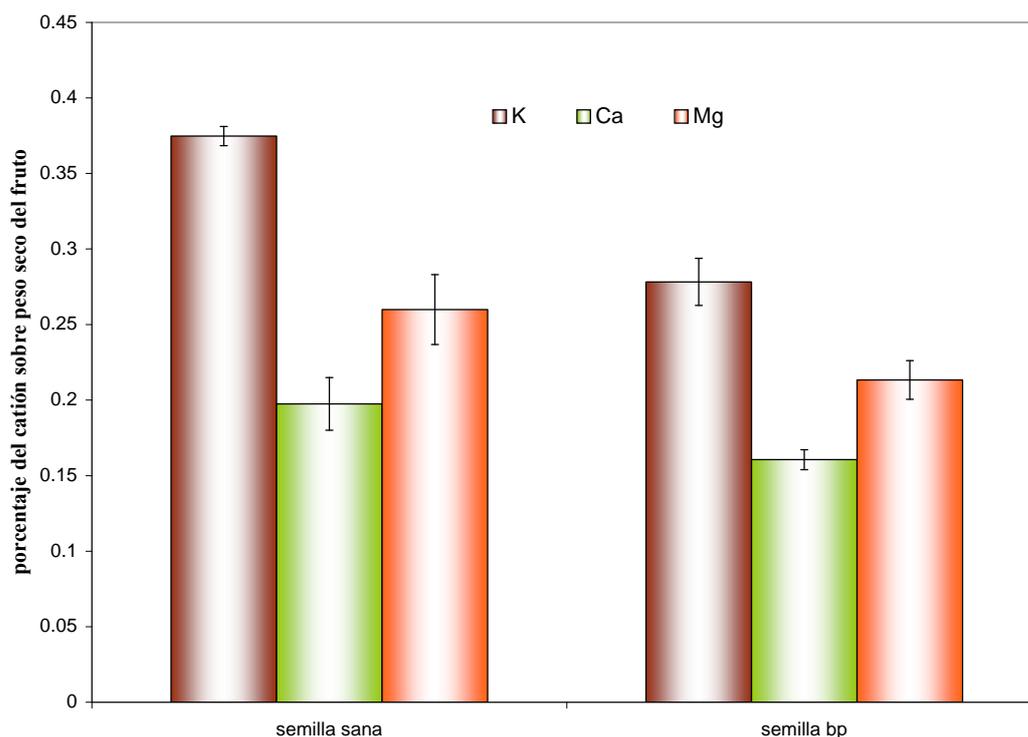


Figura 62: Composición en Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ insolubles en agua, de semillas de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica

4.7.3. Análisis de pedúnculos

A pesar, de que el pedúnculo es el único tejido que comunica el fruto con el resto del árbol, no se ha realizado estudio alguno acerca de su composición mineral. Numerosas referencias bibliográficas ponen de manifiesto la falta de relación entre la composición nutricional de la hoja con la del fruto (Marcelle, 1989). Así, no resulta descabellado pensar que además del impedimento que supone la circulación pasiva de iones en órganos con baja tasa de transpiración, también podrían existir otros impedimentos a la movilidad de los nutrientes en dirección al fruto. El pedúnculo es el elemento de soporte, primero de la flor y luego del fruto que actúa como unión con el brote. Su interior está atravesado por haces vasculares de xilema y floema que permiten la circulación de nutrientes

entre el fruto y el brote que lo sustenta, y también el paso de fotoasimilados que permiten el desarrollo del fruto y el engrosamiento del mesocarpio.

Bajo este punto de vista opinamos que podría resultar de interés aplicar la metodología analítica ya utilizada en el estudio de otros tejidos.

4.7.3.1. Composición aniónica

La **Figura 63**; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra los aniones extractados en agua. Existen pocas diferencias entre la composición de aniones soluble de una manzana control con la de una afectada por bitter pit.

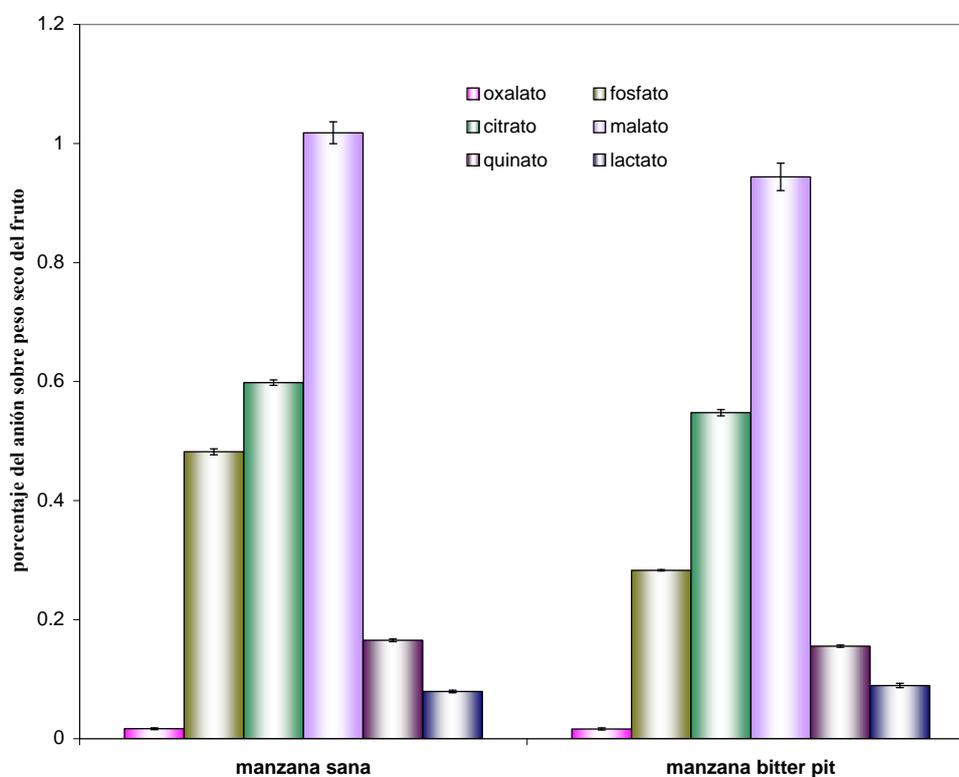


Figura 63: Composición aniónica de pedúnculos de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica.

4.7.3.2. Composición catiónica

El análisis de pedúnculos tanto de manzanas sanas como afectadas, muestra que, en la fase soluble (*Figura 64*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) no se observan diferencia en la distribución en los tres cationes estudiados. Únicamente apuntar que el rango de concentraciones solubles es menor que el de insolubles, fenómeno que ya se ha apreciado en el resto de partes del fruto analizadas exceptuando la pulpa en la que la fracción insoluble es mayoritaria.

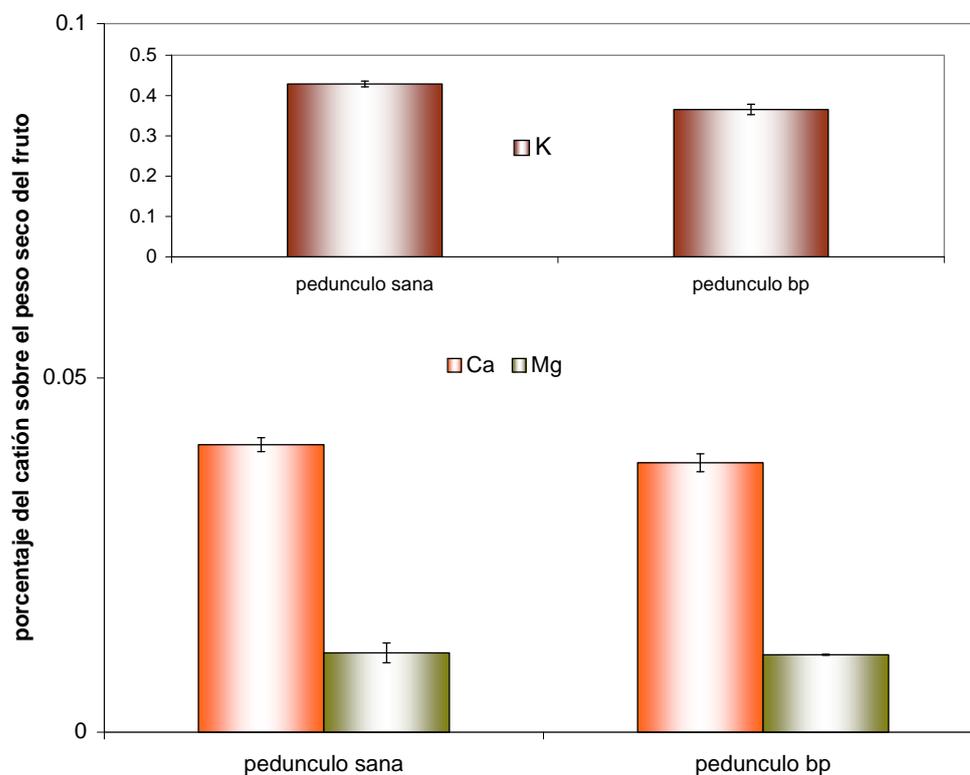


Figura 64: Composición en Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ solubles en agua, de pedunculos de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica.

Se observa una diferencia llamativa en la composición no soluble del pedúnculo (*Figura 65*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El

fruto con bitter pit presenta una concentración muy elevada de los tres cationes. Este hecho hace pensar que los cationes de los frutos afectados se encuentran retenidos por algún mecanismo e impide su circulación hacia el fruto. Este hallazgo original, es el fundamento de un estudio, en profundidad, que actualmente se está llevando a cabo en la EE Aula Dei, en el que se incluye estudios histológicos de esta parte de planta que tan poca atención ha merecido, hasta el momento.

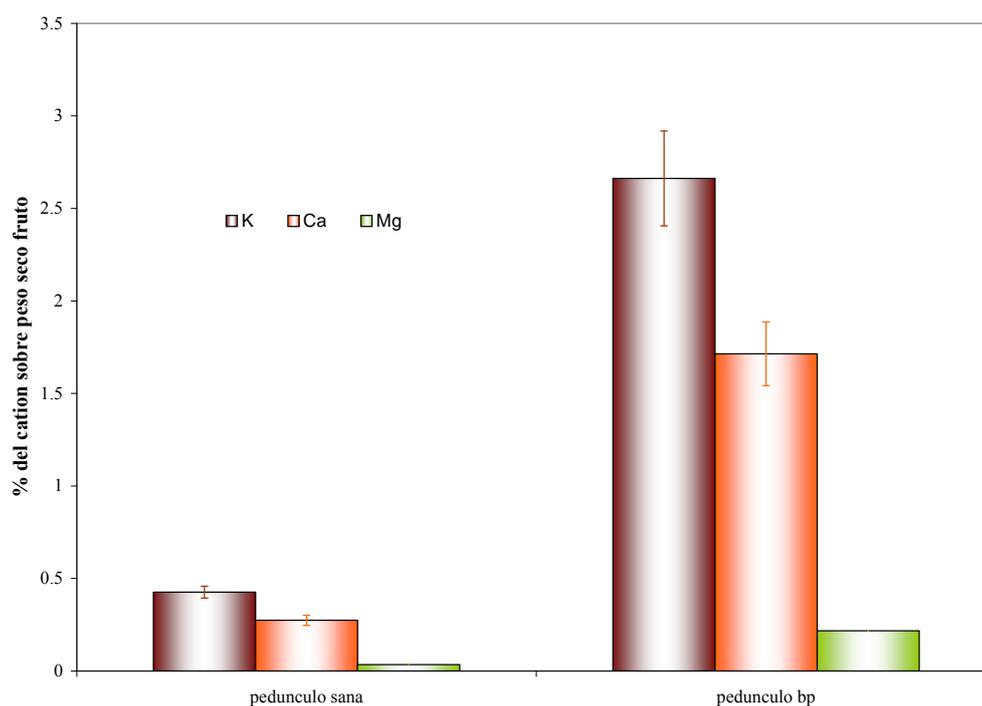


Figura 65: Composición en Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ insolubles en agua, de pedúnculos de manzana: bitter-pit y sana. Los datos son el promedio de 10 experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación típica

4.8. Distribución espacial de nutrientes en manzanas

Existe un acuerdo generalizado acerca de la mayor acumulación de manchas por bitter-pit en la parte calicina de la manzana afectada (Monge et al., 1995). En este sentido, según Cortés (2000) y Aznar et al. (2001) la mayor concentración de

manchas se produce, como ya es sabido, en la zona calícina del fruto con una acumulación del 60 y 68% de las manchas internas y externas respectivamente. Sin embargo, su dispersión no es homogénea; un solo octante de la parte calícina acumula el mayor porcentaje de manchas de la manzana y, siguiendo en orden de importancia, el octante peduncular situado justo encima de éste, es decir, una zona longitudinal de la manzana que supone el 25% del total del volumen, acumula el 47 y 51% de las manchas internas y externas respectivamente. Estos datos hacen suponer la existencia, no solo de gradientes longitudinales de Ca y Mg, sino también la de gradientes de estos elementos en la zona ecuatorial. Existe muy poca información a este respecto, si bien hay que destacar que Lewis (1980), trabajando con 9 variedades de manzana con distinto grado de susceptibilidad al bitter-pit, demuestra que, en todos los casos, existe un gradiente descendente de la concentración de Ca, desde la zona del pedúnculo hacia el final del cáliz. Concomitantemente, solo en las seis variedades susceptibles a la patología, el Mg aumenta gradualmente donde desciende el Ca.

4.8.1. Gradiente longitudinal de aniones

Del análisis cualitativo de los extractos acuosos de pulpa de manzana *Golden Smoothie*, se dedujo que las especies aniónicas mayoritarias eran, en orden decreciente de concentración: malato, fosfato, citrato, quinato y lactato. El análisis cuantitativo de los 5 puntos de muestreo descritos en el apartado 3.3.3.2, proporcionó la información reflejada en la *Figura 66*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** en la cual se representa el promedio de las extracciones realizadas en 10 manzanas.

En una manzana sana, parece que el *fosfato* se acumula en la zona más próxima a las semillas, y disminuye progresivamente conforme aumenta la distancia desde el corazón hasta el punto de muestreo. La concentración mínima de este anión se localiza en las proximidades de los extremos calicino y

peduncular. Sin embargo, el fosfato de las manzanas afectadas por bitter pit, experimenta menores variaciones y su concentración máxima se alcanza en la zona peduncular y calicina, pudiéndose relacionar con lo ya visto en el análisis por zonas *Figura 50*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** en el cual las manzanas afectadas por bitter pit presentaban mayor concentración de este anión.

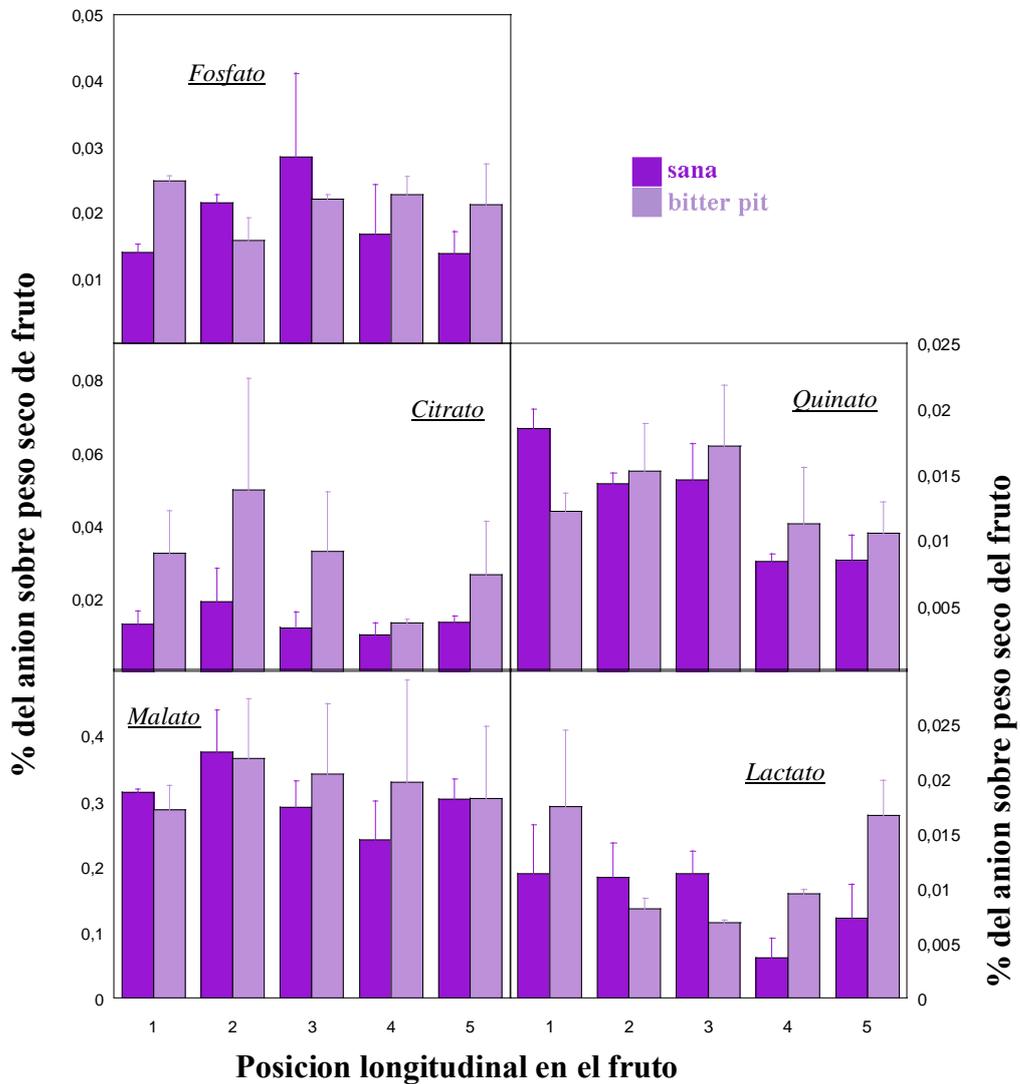


Figura 66: Gradiente de aniones en la zona longitudinal de la manzana. Los resultados son el promedio de 10 frutos \pm error típico.

Respecto al *malato*, resalta la gran diferencia de concentración de este compuesto, que varía en un rango del 1,5 a 3 % del peso seco, respecto al resto de aniones que lo hace en 0,01 y 0,4%. La distribución del *malato* es homogénea a lo

largo del eje longitudinal del fruto, y no existen grandes diferencias entre manzanas sanas y afectadas por bitter pit.

Si se estudia la distribución longitudinal del *citrato*, se observa una gran diferencia de concentración entre manzanas sanas y afectadas por bitter pit. En ambos materiales, los valores más altos se localizan en la mitad peduncular y disminuyen en las proximidades del corazón. Esta tendencia se mantiene hasta la parte central de la zona calicina, para ascender nuevamente en el punto más próximo al cáliz. Estos resultados corroboran los ya encontrados en los análisis por zonas, en los cuales la zona afectada por bitter pit acumulaba mayor concentración de citrato que el resto, y también los encontrados por Steenkamp y Terblanche (1983) que en sus análisis por cromatografía de gases detectan niveles más alto de cítrico en tejido afectado por bitter pit.

En las manzanas sanas, la concentración de *lactato* en la zona peduncular es prácticamente constante, para disminuir en la zona calicina. En las manzanas afectadas se observa que la gráfica adopta una disposición en forma de campana invertida, es decir, las menores concentraciones se localizan en la zona central. Contrastando ambos casos, se observa que en las zonas 2 y 3 existe más concentración en una manzana sana que en una afectada, en cambio en los extremos se produce el caso contrario.

Las concentraciones más altas de *quinato* se localizan en la zona peduncular, en manzanas sanas y con bitter pit. Los resultados obtenidos de material sano indican un descenso paulatino en la concentración de ácido quínico desde la zona peduncular a la calicina. En cambio, en las manzanas afectadas por bitter pit, la concentración es mínima en los extremos y máxima en el corazón. Comparando ambos tipos de manzanas, en todos los casos, existe más concentración del ácido en las afectadas, a excepción del punto de muestreo más próximo al pedúnculo, en la que se produce el efecto contrario.

4.8.2. Gradiente transversal de aniones

Una vez comprobada la existencia de gradientes longitudinales de aniones, era lógico suponer que su distribución en el plano ecuatorial también podría ser heterogénea. Para verificar esta hipótesis se tomaron muestras según el esquema representado en la *Figura 16*. De esta forma, se realizaron los análisis, por electroforesis capilar, sobre dos líneas perpendiculares que definían el plano transversal de la manzana. El objetivo de este apartado consistió en representar en el plano, mediante isolíneas, las zonas que podían agruparse en un mismo rango de concentración para, finalmente, ofrecer una imagen circular que representara la superficie de la manzana analizada.

Para realizar este trabajo y puesto que no se disponía de valores reales en cada punto de la superficie, se hizo preciso diseñar un algoritmo que permitiera deducir los valores de concentración en los puntos no incluidos en el muestreo.

La *Figura 67*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra una tabla de Excel en la que se ha aplicado el algoritmo propuesto. Los valores de la columna E (1a, 2a, 3a, 4a, 5a y 6a) representan los valores analíticos obtenidos sobre las muestras tomadas en una de las líneas, los valores de la fila 6 (1b, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b) corresponden con los obtenidos sobre una línea situada a 90° de la primera. El valor de una celda sin datos reales se calculó promediando los dos valores adyacentes más próximos a ella siguiendo la dirección de la diagonal. El valor de la celda central correspondiente a la zona ocupada por las semillas y sus alvéolos se calculó promediando el valor de las 4 adyacentes. En la *Figura 68*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra un ejemplo real de aplicación del algoritmo.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1		-3	-2	-1	0	1	2	3
2	-3	$=(C2+B3)/2$	$=(D2+C3)/2$	$=(E2+D3)/2$	1a	$=(E2+F3)/2$	$=(F2+G3)/2$	$=(G2+H3)/2$
3	-2	$=(C3+B4)/2$	$=(D3+C4)/2$	$=(E3+D4)/2$	2a	$=(E3+F4)/2$	$=(F3+G4)/2$	$=(G3+H4)/2$
4	-1	$=(C4+B5)/2$	$=(D4+C5)/2$	$=(E4+D5)/2$	3a	$=(E4+F5)/2$	$=(F4+G5)/2$	$=(G4+H5)/2$
5	0	1b	2b	3b	$=(E4+F5+E6+D5)/4$	4b	5b	6b
6	1	$=(C6+B5)/2$	$=(D6+C5)/2$	$=(E6+D5)/2$	4a	$=(E6+F5)/2$	$=(F6+G5)/2$	$=(G6+H5)/2$
7	2	$=(C7+B6)/2$	$=(D7+C6)/2$	$=(E7+D6)/2$	5a	$=(E7+F6)/2$	$=(F7+G6)/2$	$=(G7+H6)/2$
8	3	$=(C8+B7)/2$	$=(D8+C7)/2$	$=(E8+D7)/2$	6a	$=(E8+F7)/2$	$=(F8+G7)/2$	$=(G8+H7)/2$

Figura 67: Aplicación del algoritmo de interpolación en una tabla Excel

La proyección de este tipo de datos proporciona una imagen cuadrada, que si bien puede ser útil para fines de comparación, no representa fielmente la superficie estudiada. Para soslayar este inconveniente, una vez obtenida la gráfica, se procedió a realizar una distorsión circular que mantiene intactas las líneas vertical, horizontal y el valor central, pero modifica los espacios intermedios para dar una forma final asimilada al círculo.

	-3	-2	-1	0	1	2	3
-3	0,0095	0,0088	0,0061	0,003	0,0062	0,0077	0,0082
-2	0,0102	0,0115	0,0089	0,007	0,0091	0,0092	0,0087
-1	0,0089	0,0142	0,0107	0,011	0,0111	0,0092	0,0083
0	0,004	0,018	0,010	0,011	0,011	0,007	0,007
1	0,0090	0,0143	0,0109	0,011	0,0113	0,0093	0,0083
2	0,0106	0,0122	0,0101	0,009	0,0103	0,0098	0,0091
3	0,0105	0,0105	0,0088	0,007	0,0089	0,0093	0,0092

Figura 68: Aplicación del algoritmo de interpolación en un caso real. Los valores en color azul son los obtenidos del análisis y, en naranja los calculados

En el momento actual de la investigación, a pesar de haber realizado numerosas repeticiones de este experimento, no pueden ofrecerse los valores promedio de varios frutos. Al carecer de puntos de referencia en la superficie

ecuatorial del fruto, no es posible superponer los valores obtenidos en varios individuos. Sin embargo, en todas las muestras estudiadas, se aprecian tendencias comunes, y las representaciones que aparecen en las (*Figura 69*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** - *Figura 73*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), representan, con suficiente fiabilidad, el patrón general.

4.8.2.1. Fosfato

Si se observan las 2 representaciones del fosfato en la *Figura 69*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se puede comprobar que en la manzana afectada se acumula mayor concentración de este anión que en la manzana sana, al igual que hemos visto en el resto de casos analizados. Su distribución en ambas superficies varía de forma considerable. En la manzana afectada predominan altas concentraciones de fosfato, tanto en la periferia como en el centro, a excepción de unos puntos cercanos a la periferia y situados, el uno del otro, a unos 90°. En la manzana sana, cabe destacar la existencia de una simetría respecto al eje horizontal, observando un gradiente, en disminución, desde la periferia hacia el centro.

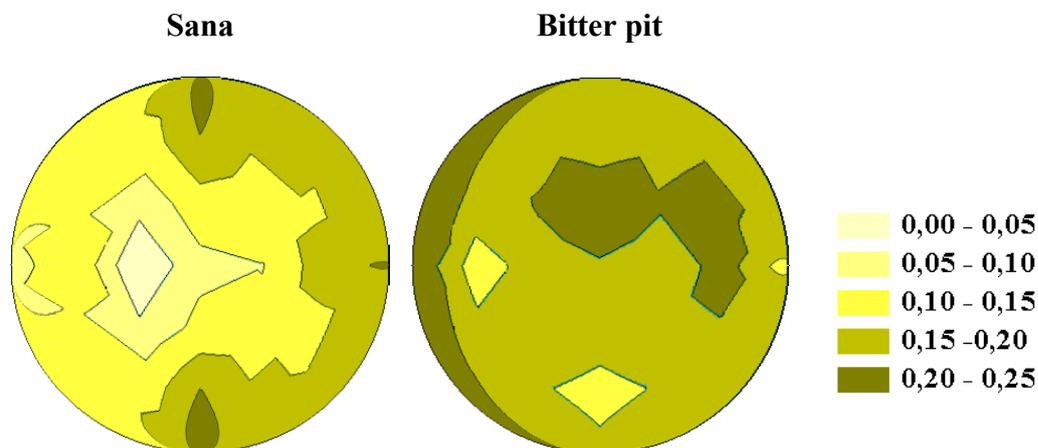


Figura 69: Representación de la concentración de fosfato en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de una afectada por bitter pit.

4.8.2.2. Citrato

En la *Figura 70*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se representan las dos imágenes correspondientes al citrato, se puede señalar que presentan cierta similitud entre ellas en el plano inferior, en el cual se encuentra el punto de más alta concentración siendo algo mayor en la manzana sana. Teniendo en cuenta la manzana afectada, se puede decir que, el plano superior horizontal prácticamente es homogéneo en concentración a excepción de la zona más cercana al centro donde se encuentran los valores más altos. En cuanto a la manzana sana, se observa que, a lo largo de todo el plano horizontal superior, se alcanza un mínimo de concentración exceptuando “dos crestas” situadas en el plano vertical, una en la zona central y otra en la periferia.

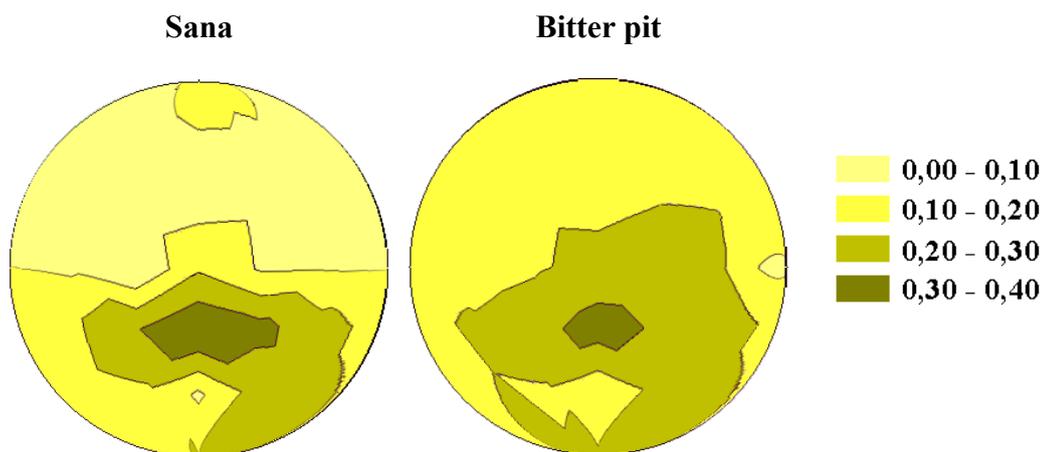


Figura 70: Representación de la concentración de citrato en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de una afectada por bitter pit.

4.8.2.3. Malato

Los gráficos que representa la concentración de malato (*Figura 71*; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), muestran la existencia de cierta

simetría respecto al eje horizontal, más marcada en la manzana sana. Si se observa la imagen correspondiente a una manzana sana en el plano vertical se puede decir que, sobre eje central, se produce una acumulación en los puntos periféricos frente al resto del fruto. Hacia la izquierda de dicho eje se presenta el mismo tipo de gradiente pero mucho más acusado. A la derecha, el rango de concentración es más alto y más homogéneo que en las explicadas anteriormente. Respecto a la manzana afectada por bitter pit se observa que predomina una zona intermedia de concentración alta, existiendo una zona de menor concentración en el lado izquierdo y una de mayor en el lado derecho.

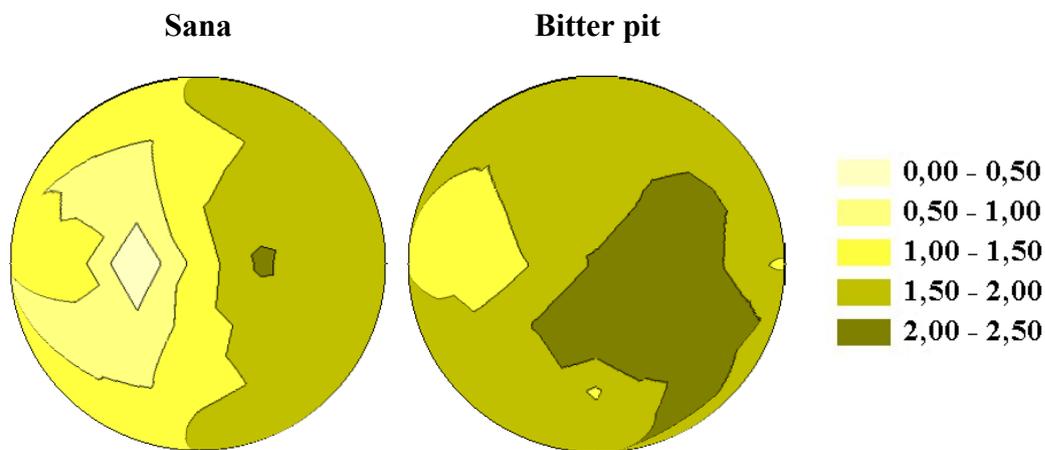


Figura 71: Representación de la concentración de malato en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de una afectada por bitter pit.

4.8.2.4. Quinato

La distribución del ácido *quínico*, en ambos tipo de manzanas (*Figura 72*) presenta características similares a los anteriores aniones. A simple vista se aprecian dos zonas predominantes, presentando mayor concentración la manzana afectada. En esta misma manzana, el quinato se acumula mayoritariamente en una de las mitades estrechándose desde la periferia hasta algo más de la zona central.

El resto de la superficie de la manzana presenta una concentración ligeramente inferior a excepción de tres polos situados a 90° cuya concentración todavía es menor. En la manzana sana, se observa que una de las mitades presenta la mínima concentración, mientras que en la otra mitad se observa un gradiente que aumenta de la zona periférica a la central.

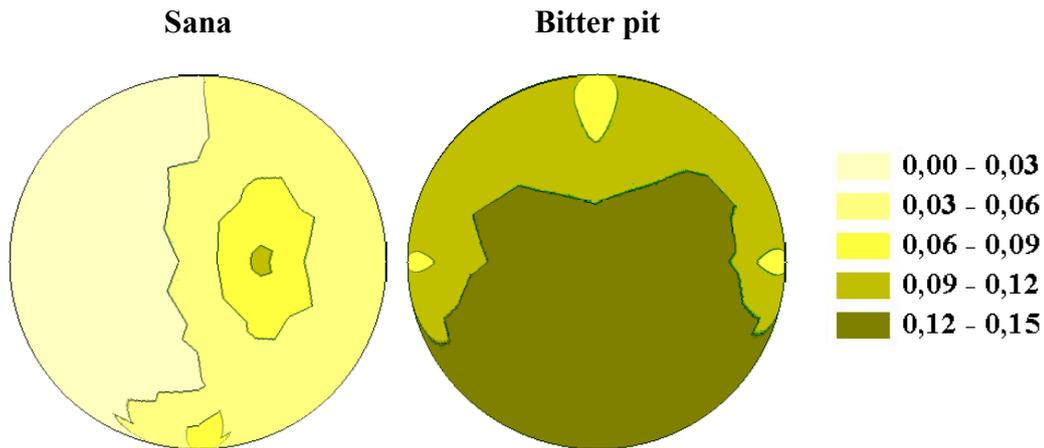


Figura 72: Representación de la concentración de quinato en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de una afectada por bitter pit.

4.8.2.5. Lactato

En la *Figura 73*, aunque los datos obtenidos se ajustan a distintos rangos de concentración, se ha mantenido el orden de intensidad en la escala de color para su mejor comprensión. Cabe destacar que en este añón se produce el efecto contrario, los mayores niveles de concentración se encuentra en la manzana sana, hecho que ya se había visto en el análisis por zonas, en el cual la zona sana de una manzana afectada presentaba mayor concentración en dicho añón que la zona afectada por bitter pit. En la manzana sana se observan dos partes diferenciadas, una de ellas en un rango inferior de concentración con un foco a 90° del extremo superior de mayor concentración. La otra mitad contiene un gradiente que

disminuye de la periferia hacia el centro, y es en este punto donde se produce un máximo de concentración. En cuanto a la manzana con bitter pit, cabe destacar la existencia de un gradiente, que disminuye desde la periferia izquierda a la derecha, encontrándose con 2 máximos situados en un mismo cuadrante a 90° y próximos a la periferia.

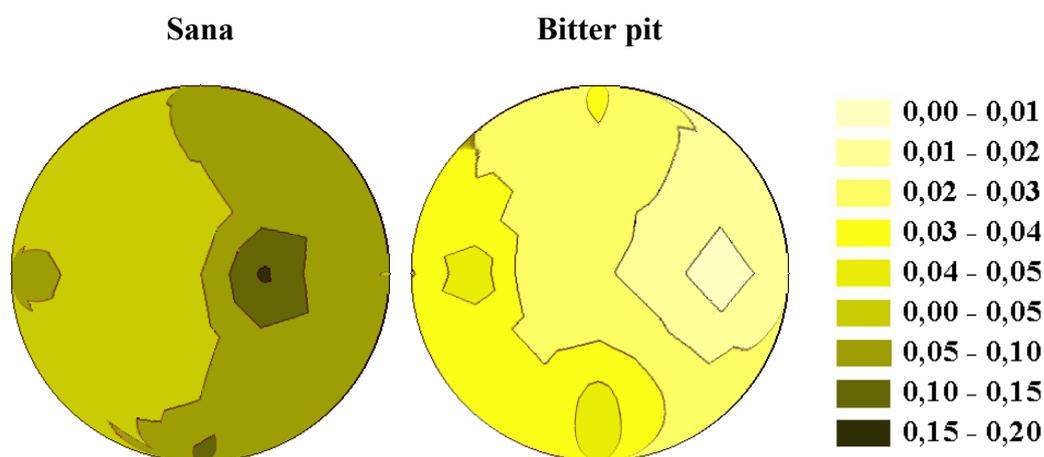


Figura 73: Representación de la concentración de lactato en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de una afectada por bitter pit.

4.8.3. Gradiente longitudinal de cationes

Tras demostrar la existencia de gradientes aniónicos en el volumen del fruto, parecía razonable suponer que la concentración de cationes también podría ser heterogénea. Además, si para la determinación de especies cargadas negativamente, no pueden utilizarse los métodos tradicionales de calcinación, puesto que se destruirían sus estructuras moleculares, el análisis de cationes inorgánicos podría ofrecer una información más completa acerca de su localización a escala celular. El estudio de la concentración de elementos minerales disueltos en el citoplasma determinados por electroforesis capilar pudo

complementarse con el análisis por absorción atómica de los elementos catiónicos insolubles que forman parte de las estructuras celulares.

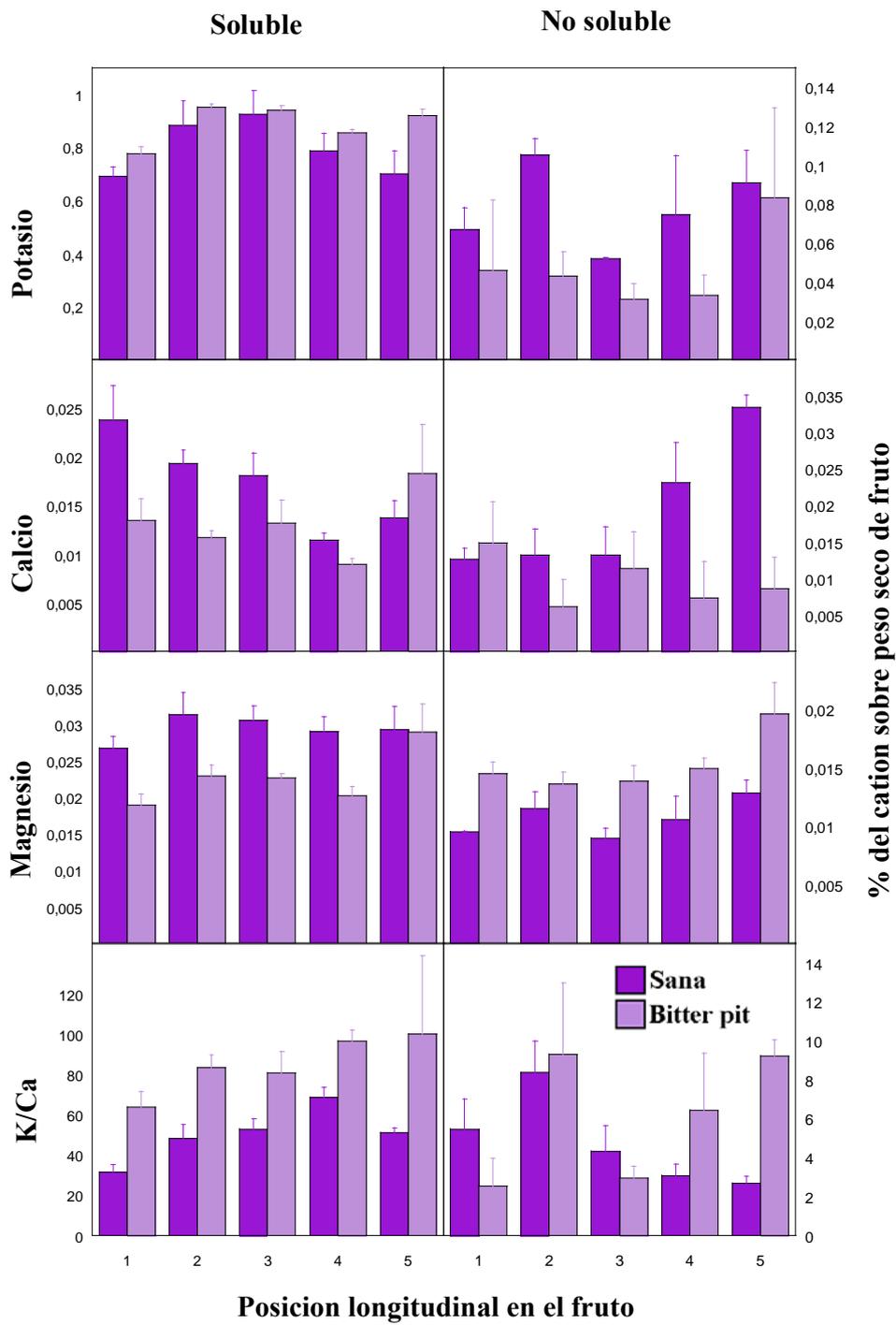


Figura 74: Gradiente longitudinal de cationes, solubles e insolubles en agua, de manzanas sanas y afectadas por bitter pit. Los resultados son el promedio de 10 frutos \pm error típico.

En la *Figura 74* se representan los resultados obtenidos en distintas extracciones correspondientes a 5 zonas, desde la peduncular (1) a la calicina (5), de manzanas cortadas longitudinalmente, como ya se explicó en el apartado 3.8.1 de Material y Métodos. Se representa, a la derecha, la concentración de los cationes extractados en agua y, a la izquierda, el contenido de los mismos en la forma insoluble.

El potasio es elemento mayoritario de los estudiados, tanto en forma soluble como en no-soluble. La fracción soluble presenta un comportamiento similar para manzanas sanas y afectadas por bitter pit, siendo su concentración ligeramente superior en estas últimas. Se observa además, la existencia de un gradiente a lo largo del eje vertical del fruto, presentando la mínima concentración en la zona peduncular (sana y afectada) y para el caso de la manzana sana su máximo valor correspondería al punto más próximo a las semillas y en el caso de la manzana afectada correspondería al punto intermedio situado entre la zona peduncular y las semillas. La mayor diferencia de concentración entre la manzana sana y la afectada se encuentra en la zona calicina del fruto. En cuanto al K no soluble lo primero a destacar es su menor presencia en esta forma. Al contrario que en la fase soluble presenta mayores concentraciones para la manzana sana con su máximo valor en el punto situado entre la zona peduncular y las semillas. En cambio en la manzana con bitter pit su máximo de concentración se produce en la zona calicina.

El siguiente catión representado en la figura es el calcio. El calcio soluble se encuentra en mayor concentración en la manzana sana a excepción del último punto que corresponde a la zona calicina del fruto donde es mayor la concentración para la manzana afectada por bitter pit, como ya se ha visto en los análisis hechos por zonas de afección. En este trabajo se demuestra la existencia de gradientes longitudinales de Ca^{2+} soluble en las manzanas afectadas o no por bitter-pit. Estos datos, sugieren que el equilibrio entre el Ca^{2+} citosólico y el

estructural, en áreas concretas del fruto, podría ser un factor crucial para el desarrollo del bitter-pit.

En cuanto al magnesio se observa un comportamiento de la forma soluble opuesto al de la insoluble, presentando los mayores valores para el caso de la manzana sana en la forma soluble y para la manzana afectada en la insoluble. En el punto más próximo al cáliz, en ambos tipos de manzanas, se igualan las concentraciones de este elemento.

Por último, se estudió la relación K/Ca, observando unos valores de concentración mucho más altos en la fase soluble. En esta fase la manzana afectada por bitter pit presenta unos índices superiores a la manzana sana. En cambio, en la fase hidrosoluble esa tendencia se alterna en los tres primeros puntos muestreados para terminar aumentando en la manzana afectada en los dos últimos puntos del gradiente longitudinal.

De los resultados mostrados en la *Figura 74* no pueden deducirse patrones claros de comportamiento que justifiquen los obtenidos en los análisis de zonas concretas del fruto, afectadas o no por la fisiopatía (*Figura 52-Figura 53*). Tras estos datos, no parece claro que se desarrolle la enfermedad a causa de previos desequilibrios nutricionales localizados. Es decir, es innegable que el magnesio soluble es casi 7 veces más alto en las manchas de bitter-pit que en el resto de tejidos, pero en el tejido sano adyacente y la pulpa de la manzana sana apenas se diferencian. Algo similar ocurre con el calcio y potasio insolubles en las zonas afectadas. Así pues, del análisis nutricional, aunque se realice en partes muy concretas de la manzana, creemos muy difícil extraer la información necesaria para predecir la posible aparición de la fisiopatía. En otras palabras, debe existir otro tipo de mecanismos, aparte de la distinta distribución de nutrientes, que induzcan la aparición de síntomas. Hasta el momento, no hemos sido capaces de seguir la formación natural de las manchas, lo que quizá arrojaría alguna luz acerca de los procesos implicados. En la actualidad, se están obteniendo los

primeros resultados de experimentos tendentes a inducir artificialmente la enfermedad. Cuando se disponga del procedimiento adecuado y se compruebe que las manchas inducidas son similares a las que ocurren naturalmente, se estará en disposición de analizar estos tejidos en el inicio del proceso degenerativo y podrá determinarse, al menos, la secuencia de acontecimientos que provocan la acumulación de determinados nutrientes en las áreas afectadas.

4.8.4. Gradiente transversal de cationes

La representación de la concentración de cationes en el plano ecuatorial de la manzana se realizó de la misma forma similar que la de aniones. En el mismo gráfico aparece a la izquierda la fracción soluble del catión y a la derecha la insoluble. En la parte inferior se muestran los resultados obtenidos de la manzana afectada por bitter-pit, y en la superior los de una manzana sana (*Figura 75-Figura 77*).

4.8.4.1. Calcio

La concentración de Ca^{2+} soluble, en la manzana sana aumenta desde el epicarpio, donde se observan los valores más bajos, hasta una zona de la pulpa próxima al endocarpio (*Figura 75; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Su distribución muestra una cierta simetría axial respecto a dos ejes ortogonales. Sin embargo, la fracción no soluble de este elemento, se distribuye de forma muy distinta; es bastante uniforme en toda la superficie excepto en una de las zonas de la periferia, donde se acumula preferentemente. En este último caso la representación de esta concentración es simétrica respecto a un diámetro que marcaría un fuerte gradiente descendente, desde un extremo del círculo al otro.

En la manzana sana los rangos de concentración de la fracción soluble y la no-soluble son similares, mientras que, en la afectada, el calcio insoluble es más

alto.

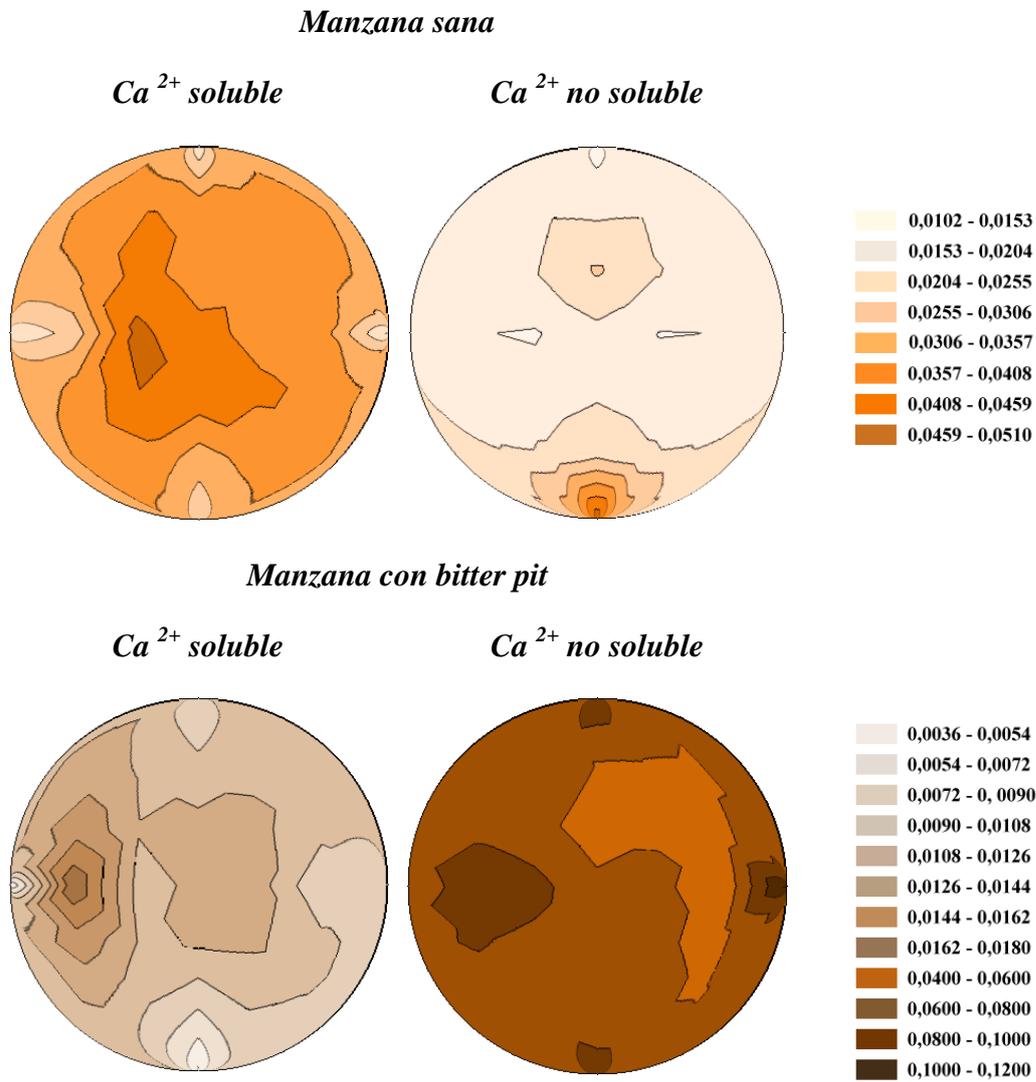


Figura 75: Representación de la concentración del calcio soluble e insoluble en agua, en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de otra afectada por bitter-pit.

En el fruto afectado por bitter-pit, y tomando como referencia el eje vertical del círculo representado en la gráfica, se observa un gradiente de concentración de calcio soluble con sus niveles más bajos en las zonas opuestas del epicarpio y con

un máximo situado en la zona del endocarpio. Respecto al eje horizontal, se aprecia otro máximo de concentración en la zona mesocárpica izquierda. En cambio, y al igual que ocurría en la manzana sana, la distribución del calcio no soluble es más homogénea, a excepción de una zona del mesocarpio donde se encuentra el valor mínimo; y de otras cuatro zonas próximas al epicarpio, situadas a 90° entre sí, en las cuales, la concentración es mayor que en el resto de la pulpa.

4.8.4.2. Magnesio

En la manzana sana se aprecia simetría respecto al eje horizontal que sería perfecta exceptuando la presencia de un pozo de concentración en un punto periférico del eje vertical. Aunque, en principio, predomina una concentración intermedia, se observan dos picos de mayor concentración, en la zona mesocárpica, dispuestos a ambos lados del eje vertical. El magnesio no soluble se distribuye irregularmente, presentando tres focos de concentración máxima en el pericarpio situados a 90° entre sí, y un cuarto foco a 90° de dos de los anteriores con mínima concentración. El resto de la superficie transversal de la manzana está compuesta por dos partes diferenciadas e inversas en concentración. Hay que resaltar que el rango de concentración de la fracción hidrosoluble es mayor que el de la insoluble (*Figura 76; Error! No se encuentra el origen de la referencia.*).

La concentración de Mg^{2+} soluble en el corte transversal de una manzana con bitter pit, se distribuye desigualmente en dos semicírculos separados por el eje vertical del gráfico; en uno de ellos la concentración es homogénea, mientras que en la otra mitad se aprecia un gradiente que disminuye desde el epicarpio al endocarpio. Los rangos de concentración del Mg^{2+} insoluble de la manzana afectada son mucho más bajos que en el caso de la fracción soluble explicada anteriormente. Su disposición en la superficie de fruto analizada es tal, que existe una simetría casi perfecta, respecto al eje horizontal, y aunque la concentración

mayoritaria sea muy baja, se observa un gradiente, en ese mismo eje, que aumenta desde el centro hasta la periferia.

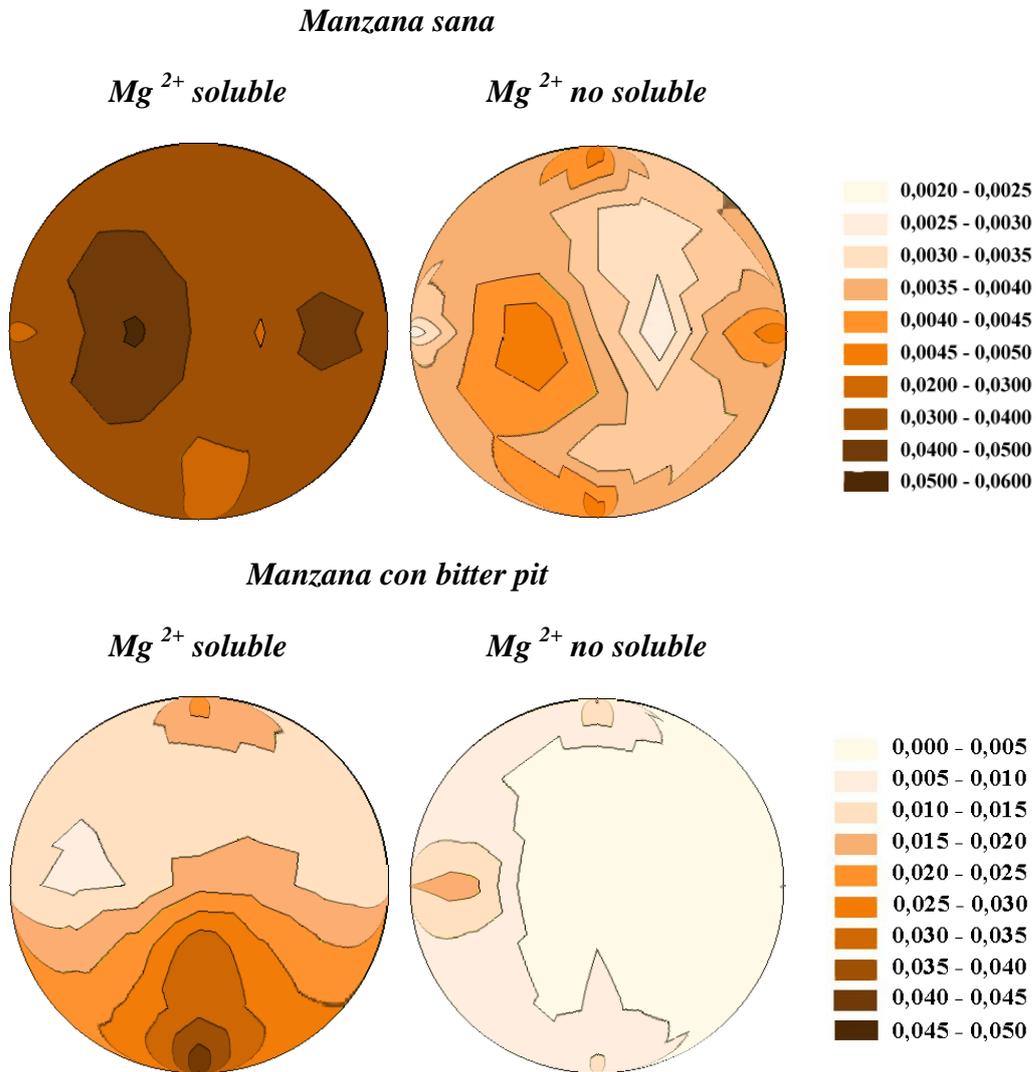


Figura 76: Representación de la concentración del magnesio soluble e insoluble en agua, en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de otra afectada por bitter-pit.

4.8.4.3. Potasio

Es el elemento que se encuentra en mayor concentración en la fracción soluble en agua, tanto en las manzanas sanas, como en los frutos afectadas por bitter pit. La

relación $K^+_{soluble}/K^+_{insoluble}$ es aproximadamente 5/1, tanto en las sanas, como en las afectadas. Destaca la homogeneidad de concentración en las fases solubles (*Figura 77*). No se encuentra excesiva variabilidad en el potasio soluble de una manzana sana, aunque en valor absoluto, son más pronunciadas debido a las elevadas concentraciones. Del gráfico se deduce la existencia de una gran simetría respecto al eje horizontal, sobre el que se sitúa un gradiente ascendente, de izquierda a derecha, hasta llegar a un máximo en la zona mesocárpica, a partir del cual se forma un valle que termina en el rango de concentración intermedio de dicho gradiente. También se observa un gradiente en el potasio insoluble de la manzana sana, pero esta vez no se encuentra situado en ninguno de los ejes principales sino que describe una trayectoria que se inicia en uno de los polos del eje vertical con concentración mínima, para continuar de forma creciente en línea oblicua. Asimismo, existen otros dos polos situados a 90 y 180° del anterior respectivamente, con una concentración superior al primero pero sin alcanzar los máximos.

Respecto a la disposición del potasio soluble en una manzana con bitter pit, al igual que en el caso de una manzana sana, también existe simetría respecto a uno de los ejes. Tomando como referencia el eje vertical, se observa un aumento gradual de concentración hasta llegar a un máximo cercano a la zona endocárpica, para posteriormente decrecer, pero sin alcanzar el valor mínimo encontrado en esta superficie. En el eje horizontal, también se aprecia un gradiente, aunque no tan acusado como en el caso anterior, situándose el máximo en la parte central. También se observa simetría, respecto al eje horizontal, para el potasio no soluble de una manzana afectada. Lo más destacado de esta imagen son los dos focos centrales, con concentración mínima, situados a ambos lados del punto central sobre uno de los ejes. Además, habría que resaltar que el máximo de concentración se encuentra en el eje horizontal a 90° de ambos mínimos. El resto de la superficie transversal presenta concentraciones intermedias.

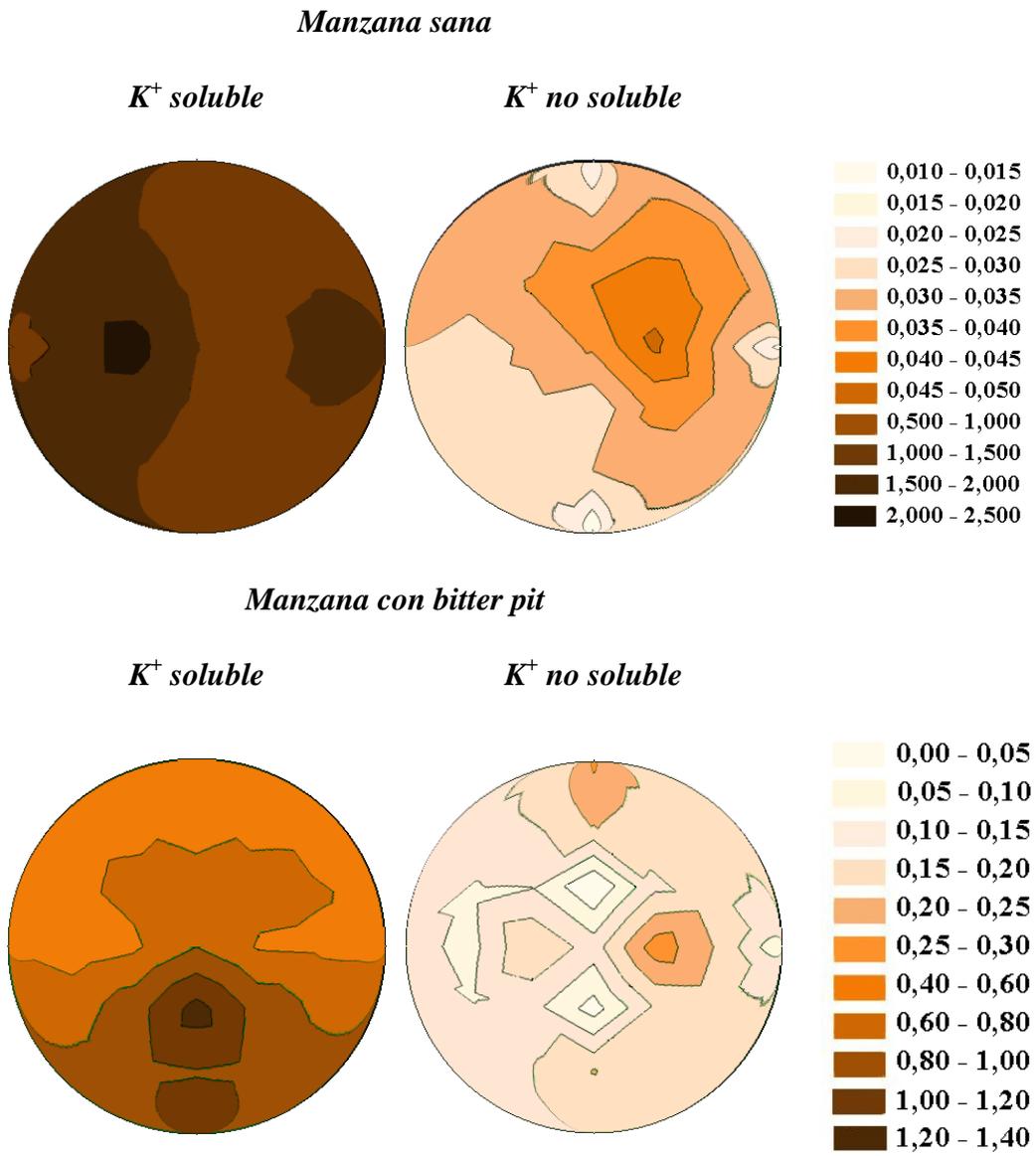


Figura 77: Representación de la concentración del potasio soluble e insoluble en agua, en el plano ecuatorial de una manzana sana y en el de otra afectada por bitter-pit.

4.9. Consideraciones Finales

El bitter-pit es uno de los problemas más acuciantes, respecto a la calidad del fruto, que sufren los productores y exportadores de manzanas de España y otros países. Los síntomas del bitter pit aparecen, principalmente en postcosecha, como áreas pardas en la superficie del fruto, que deprecian el valor del producto, haciendo que sea imposible su comercialización para consumo en fresco. La investigación realizada durante los últimos 50 años sostiene que la incidencia de esta alteración está inversamente relacionada con la concentración de calcio en fruto y es directamente proporcional a las concentraciones de magnesio, potasio, fósforo y nitrógeno (Garman y Mathis, 1956; Fallahi et al., 1997). Potasio y magnesio compiten con el calcio debido a que son iones con carga positiva y el nitrógeno porque favorece el crecimiento de brotes sobre el de frutos. (Kotze, 1979; Johnson, 1987). La humedad del suelo, la nutrición mineral y el crecimiento vegetativo influyen la concentración de calcio en los tejidos vegetales que determinan la aparición de los síntomas de la deficiencia. Durante los periodos de crecimiento, en los días calientes y soleados del verano, la tasa de transpiración es alta, y el estrés hídrico puede provocar la exportación de agua y calcio desde el fruto en desarrollo, si los sistemas de irrigación no están optimizados. Si esta tasa de exportación excede la de entrada de calcio, la concentración en fruto disminuye.

Así pues, se sigue considerando que la deficiencia de calcio en el fruto es la principal causa de la aparición del bitter-pit, de forma que habitualmente se aplican tratamientos foliares, durante su desarrollo para incrementar el contenido de calcio y así reducir la incidencia de bitter pit durante el almacenamiento. Sin embargo, estas aplicaciones, que generalmente contienen cloruro y nitrato de calcio, u otras formulaciones, no son muy efectivas para hacer descender la incidencia de la fisiopatía (Mata, 2000).

El tamaño de fruto es uno de los más importantes índices de calidad de las manzanas y, se ha descrito, que los frutos más grandes sufren mayor afección de bitter-pit que los de menor tamaño (Sharples, 1964; Volz et al., 1993). Sin embargo, Link, en 1973, señaló que el tamaño no podía considerarse un factor importante con respecto a la susceptibilidad del fruto al bitter pit, sino que su incidencia dependía de la relación hoja / fruto, y en particular, de la intensidad del crecimiento vegetativo durante los primeros meses del ciclo anual. Estas consideraciones fueron confirmadas por Blasco (1977) en un ensayo realizado con manzanos adultos a los que se les impusieron distintas cargas de cosecha y los resultados mostraron que los frutos de mayor calibre (árboles con baja carga de cosecha) no desarrollaron significativamente más bitter pit que los frutos de menor tamaño. El tamaño de fruto está condicionado por el número total de células y por el volumen de las mismas. Así, cuando se representa la evolución del calibre o peso a lo largo de la estación, la curva ideal de la gráfica debería tener un aspecto de S. Esta curva debe ser sigmoidea debido a la acción conjunta de la división celular, el crecimiento de las células y la formación de espacios de aire (Westwood, 1993). En nuestro caso, se ha realizado el ajuste de los pesos seco y fresco a ecuaciones logísticas (*Figura 27*), obteniéndose, en todos los casos, coeficientes de correlación excelentes. Pudiendo afirmarse que el crecimiento de la manzana es lento al principio de la estación, rápido en los días posteriores al cuajado y más lento a medida que alcanza la madurez.

Otro de los parámetros importantes respecto a la calidad de fruto es el contenido en carbohidratos solubles que, junto con la acidez, condiciona el sabor de la manzana. El contenido de sólidos solubles aumenta conforme el fruto se va desarrollando, al principio de forma lenta y más rápidamente cuando se acerca la fecha de la recolección (*Figura 27*). Los valores obtenidos durante los tres años se encuentran dentro del rango recomendado para las manzanas del grupo Golden (Carrera, 1999). También, se ha demostrado la existencia de una relación entre

sólidos solubles en fruto y concentración foliar de clorofila (*Figura 28*). Como consecuencia de este hallazgo es posible predecir la concentración de carbohidratos solubles en la manzana mediante sencillas medidas de SPAD, lo que permitiría conocer el índice de madurez de la fruta sin necesidad de recurrir a pruebas destructivas.

A medida que la estación avanza se producen cambios en la concentración de los nutrientes en hoja y fruto. Es interesante determinar si el contenido mineral se encuentra en un nivel adecuado o, por el contrario, el cultivo sufre de excesos o déficits en alguno de los nutrientes evaluados. En el periodo estudiado se ha observado que, en hoja, nitrógeno, potasio, fósforo y cobre disminuyen su concentración a lo largo de la estación; calcio, hierro y magnesio, aumentan (*Figuras 31- 32- 33*); mientras que el contenido de cinc y manganeso no sigue un patrón tan definido como en los otros casos. Estos resultados que están, en líneas generales, de acuerdo con los recogidos por Gagnard (1987) de diversos autores, y podrían explicarse en función de la movilidad de los diversos nutrientes en los órganos. A medida que las hojas envejecen acumulan Mg, Ca, S y otros elementos poco móviles, como el Fe, mientras que los más fácilmente traslocables, como N, P y especialmente, K se redistribuyen hacia las hojas jóvenes disminuyendo su concentración conforme la planta madura (Gil, 1995).

Los contenidos minerales en fruto se determinaron a lo largo de la estación, observándose que todos ellos disminuyen a medida que el fruto aumenta de tamaño. Sin embargo, aunque la concentración disminuye, la cantidad de minerales en fruto aumenta durante el periodo de desarrollo, como se observa en los resultados obtenidos al calcular la tasa de acumulación de nutrientes en función del peso seco del fruto (*Figura 40-41- 42*). Estos resultados contradicen la tradicionalmente aceptada teoría de Faust y Shear (1971), recogida posteriormente en obras de prestigio como la de Bergmann (1992), en la que se postula que, a partir del cuajado, la concentración en fruto permanece prácticamente constante,

de forma que los frutos más grandes contienen menor cantidad de calcio que los pequeños. Si bien es cierto que se diluye la concentración al crecer el fruto, durante una fase de su desarrollo, de forma exponencial, mientras que los nutrientes se acumulan de forma lineal, en este trabajo se demuestra que el calcio y el resto de nutrientes se acumulan en el fruto con una tasa prácticamente constante a lo largo de su desarrollo (*Figura 45*). Nuestros resultados concuerdan y amplían los expuestos por Tomala (1989), Plisek (1995) y Broom (1998), autores que sugieren la existencia de un incremento continuo de la concentración de calcio en manzana mientras el fruto permanece en el árbol.

El estado nutricional diagnosticado a través del índice DOP (Montañés, 1991) indica posibles deficiencias en micronutrientes y calcio y excesos en magnesio y potasio en hoja, aunque no se observaron síntomas visuales en campo, a excepción de manganeso y cinc. El contenido mineral del fruto en el momento de la recolección condiciona su potencial de almacenamiento ante la aparición de posibles desordenes como bitter pit. A partir de las concentraciones óptimas (*Tabla 10*) en el momento de la recolección se determinaron los índices DOP (*Tabla 12*), observándose que la concentración de Ca^{2+} se situó por debajo del valor de referencia obtenido de manzanas con probadas aptitudes de almacenamiento. Los frutos de la plantación sufren un marcado desequilibrio nutricional que se fue aliviando con el transcurso de los años, en lo que a macronutrientes se refiere.

El estudio del bitter pit y su relación con el contenido mineral, tanto de frutos como de hojas ha sido ampliamente descrito a lo largo de los últimos años. La concentración de calcio y las relaciones de este elemento con el potasio y el magnesio son muy estudiadas por los efectos antagónicos que se presentan entre estos nutrientes. En los tres años estudiados la tendencia en hoja es similar, disminuyendo hasta llegar a valores comprendidos entre 1 y 1,5 al final de la cosecha para K/Ca y algo mayores en la relación entre potasio, calcio y magnesio

debido a la contribución de este último (*Figura 36*). En fruto, se ha utilizado profusamente como parámetro de predicción de la calidad de almacenamiento de las manzanas, la relación K/Ca, encontrándose correlaciones positivas con la incidencia de bitter pit (Tomala, 1997; Sió et al., 1998). En 1997 se obtuvieron valores, en cosecha, muy elevados de esta relación debido a la baja concentración de calcio (*Tabla 13*), sin embargo, en los siguientes años los valores fueron menores, en torno a 20, límite a partir del cual se considera que existe riesgo de bitter pit (*Figura 40*). Sin embargo, durante los tres años la incidencia de bitter-pit fue prácticamente la misma (80% tras dos meses de almacenamiento), lo que podría conducir a pensar que quizá el valor de esta relación en hoja tenga mayor capacidad de predicción que su homónima en fruto.

El análisis floral es una herramienta que puede utilizarse para conocer el estado nutricional de la planta. Se han descrito correlaciones entre los contenidos de nutrientes en flor con los correspondientes en hoja a los 60 días tras plena floración (Sanz et al., 1995). Sin embargo, hasta ahora, no se había planteado situar los resultados del análisis de flor como punto inicial de la evolución de hojas y frutos. En este trabajo se demuestra la coherencia de la hipótesis expuesta en ambos órganos (*apartado 4.4.*), lo que justifica las correlaciones encontradas por el resto de autores con el material foliar, e introduce el uso de los datos florales como herramienta de diagnóstico e incluso predicción del estatus nutricional de los frutos.

Numeroso trabajos de investigación indican que el metabolismo del calcio juega un papel clave en el desarrollo del Bitter-pit (Monge et al., 1995; Lang y Voltz, 1998). En general, se acepta que el bitter-pit es el resultado de una deficiencia de calcio en el fruto. Sin embargo, esto no debe ser totalmente cierto, teniendo en cuenta que, según se demuestra aplicando el método de tinción selectiva de calcio, el tejido afectado contiene mayor concentración de calcio que el sano (*Figuras 47-48*). Al utilizar este procedimiento, la huella del calcio no

aparece sobre la superficie de la manzana (exceptuando la zona de bitter-pit), sino sobre el papel de filtro impregnado en la mezcla de reactivos. Este dato sugiere que la reacción del calcio con el reactivo utilizado, posiblemente revele la presencia de calcio soluble. Esta hipótesis se apoyaría por los resultados mostrados en las *Figuras 53-54*; en las que se puede observar mayor cantidad de calcio soluble en las manchas y en el fruto sano que en el tejido sano adyacente al afectado. Si la tinción selectiva, revelase el calcio insoluble, según la *Figura 54*, aunque las manchas aparecieran más coloreadas, la pulpa de la manzana sana tendría una tonalidad más tenue que la de la afectada. Como puede comprobarse en las citadas figuras, esto no se produce, sino que la tinción de manzanas sanas proporciona una coloración más intensa que la de las afectadas, exceptuando las zonas de las manchas. Sin embargo, sobre la superficie del fruto exclusivamente se colorean de rojo, por efecto del reactivo, las manchas de bitter-pit. Así, puede deducirse que estas áreas contienen algún complejo insoluble de calcio que no está presente en el resto de las células del fruto. Esta forma no soluble exclusiva de las manchas se localiza en el apoplasto de estas células, es decir en sus paredes y espacios intercelulares. La certeza de esta aseveración proviene de una serie de experimentos de tinción con el reactivo para calcio que fueron realizados para el estudio histológico de esta fisiopatía. En la *Figura 79* se aprecia que únicamente se tiñe de rojo la zona de bitter-pit y, en la *Figura 80*, se observa nítidamente la intensidad de color que aparece en las paredes celulares del tejido afectado.

Microscopio

Existen evidencias de una relación más estrecha entre madurez y separación intercelular de los puentes de calcio que se forman en la pectina de la lamela media. Así, conforme avanza el proceso de maduración se produce una pérdida de rigidez de estas membranas (Stow, 1993). Por otra parte, Marschner (1995) sugiere la posibilidad de que en las manchas de bitter-pit, se produzca la solubilización del Ca^{2+} de las paredes celulares, para redistribuirse en el interior de la célula y acumularse preferentemente en la vacuola. Esto sería consecuencia de un descenso en la actividad poligalacturonasa y de la activación del sistema generador de etileno, que se localiza en la membrana plasmática de la pared celular (Mattoo y Lieberman, 1977). Así pues, este calcio libre en el interior de la vacuola sería soluble en agua y se encontraría en mayor proporción en los tejidos afectados por bitter-pit que en los sanos. Sin embargo, los análisis de las tres clases de tejido de manzana demuestran que justamente sucede el proceso contrario; en la zona sana de los frutos sano y afectado, la fracción de calcio soluble supone 55-75% del total del elemento, mientras que en la zona afectada este valor desciende hasta el 30%. Por lo tanto, el calcio de las manchas no se solubiliza para formar parte de la vacuola sino que permanece en forma insoluble en la pared celular, cómo se ha demostrado en párrafos anteriores.

Considerando los valores absolutos de calcio soluble e insoluble en los tres tejidos (*Figura 52-54*), es de destacar que la suma de las dos fracciones, en la manzana sana, no excede la encontrada en el tejido sin síntomas del fruto afectado. Esto indica que la baja concentración de calcio en fruto, *per se*, no desencadena la patología. Estos resultados no contradicen necesariamente la creencia, generalmente aceptada, que relaciona el bitter-pit con el calcio de la manzana. Es posible que ante una abundancia de calcio que induzca un buen estado sanitario del fruto, los mecanismos que desencadenan la patología queden enmascarados y, por tanto, se retrase o incluso desaparezca la aparición de los síntomas. No hay que olvidar que, según Fallahi et al. (1997), concentraciones

altas de calcio en frutos y verduras aumentan su longevidad en postcosecha ralentizando la senescencia, previniendo ciertas alteraciones relacionadas con la deficiencia de calcio y suprimiendo la descomposición que producen determinados microorganismos patógenos. Pero en nuestras condiciones de trabajo, que consistieron en utilizar una variedad susceptible, implantada en una parcela que produce un alto grado de afección, a pesar de los tratamientos (Mata, 2000), la cantidad del elemento en fruto es limitante. En estas circunstancias, cobrarán relevancia el resto de procesos que favorecen el bitter-pit.

5. Conclusiones

Conclusiones agronómicas:

1. Durante los tres años de experimentación en campo, la modificación de la carga de cosecha, los tratamientos con compuestos de calcio y con reguladores de crecimiento aplicados a la parte aérea del árbol, no produjeron diferencias estadísticamente significativas, en los parámetros estudiados.
2. El contenido en sólidos solubles aumenta con el desarrollo del fruto, al principio de forma lenta y más rápidamente cerca de la recolección. Asimismo, se demuestra la existencia de una relación lineal entre sólidos solubles en fruto y concentración de clorofila foliar.
3. Se ha estimado el estatus nutricional de la plantación mediante el método DOP. En hoja se encontraron excesos de nitrógeno, potasio y magnesio, y valores bajos de Ca, Fe, Mn y Zn. En fruto se han registrado fuertes deficiencias de calcio concomitantes con excesos de magnesio.
4. Las concentraciones foliares de nitrógeno, potasio, fósforo y cobre, elementos móviles en el floema y fácilmente traslocables, disminuyen a lo largo de la estación; mientras que aumentan las de calcio, hierro y magnesio, que se acumulan en los tejidos más viejos al circular, de forma pasiva, por el flujo de transpiración.
5. La concentración de nutrientes en fruto disminuye conforme aumenta el tamaño de las manzanas, pero no se interrumpe la entrada de elementos minerales en ningún momento de su desarrollo. Asimismo, se ha demostrado que el calcio y el resto de nutrientes se acumulan en el fruto con una tasa prácticamente constante a lo largo de su desarrollo. Estos resultados contradicen la teoría tradicional que afirma que, a partir del cuajado, se detiene la asimilación de calcio por parte del fruto.

6. La relación K/Ca es menos variable, de una estación a otra, en hoja que en fruto. Al obtener los tres años similares porcentajes de afección por bitter pit, se sugiere que esta relación, en tejido foliar, es más útil, con fines de diagnóstico, que su homónima en fruto.
7. Los resultados del análisis de flor se pueden situar como punto inicial de la evolución de nutrientes tanto en hojas como en frutos. Esto justifica las correlaciones encontradas por otros autores con el material foliar, e introduce el uso de los datos florales como herramienta de diagnóstico e incluso predicción del estatus nutricional de los frutos.

Conclusiones fisiológicas:

1. El método de tinción selectiva de calcio en secciones de manzana, revela una acumulación de calcio en las zonas afectadas por bitter pit, menor concentración en las zonas adyacentes y una distribución uniforme en la pulpa de los frutos sanos. La observación al microscopio de las manchas de bitter pit teñidas directamente, indica que la fracción apoplástica de estas células, debe contener algún complejo insoluble de calcio que no está presente en el resto del fruto.
2. Los análisis de tejidos demuestran que las áreas de bitter pit contienen más calcio insoluble y magnesio soluble que el tejido sano adyacente y que la pulpa de manzanas sanas. Se propone, como hipótesis de trabajo, que la baja concentración de calcio en fruto, *per se*, no desencadena el bitter-pit. Únicamente, cuando la cantidad del elemento en fruto es limitante, cobrarán relevancia otros procesos que inducen la aparición de la fisiopatía, entre otros, el exceso de magnesio libre en el citosol.
3. Se ha encontrado una acumulación de cationes insolubles en el pedúnculo de manzanas afectadas por bitter pit. Esto sugiere que los cationes de los frutos

afectados pudieran estar retenidos en los haces vasculares del pedicelo por restricciones en su circulación hacia el fruto.

4. Queda demostrada la heterogénea distribución de cationes y aniones no solo respecto al eje longitudinal de la manzana, sino también en la superficie ecuatorial de la misma. Los datos mostrados en este trabajo son solo resultados preliminares que ayudarán a la construcción de un modelo espacial que refleje la distribución cualitativa y cuantitativa de aniones y cationes dentro del fruto.

6. Bibliografía

- AGUSTÍ, M. (2000). Crecimiento y maduración del fruto. *En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill Interamericana. Cap.26: 419-433.*
- ALDRICH, S.R. (1980). Plant analysis: problems and opportunities. L.M. Walsh and J.D. Beaton (eds.). *Soil Testing and Plant Analysis. Soil Science Society of America, Madison WI, 213-221.*
- ALEXANDRE, J., LASSALLES, J. P., KADO, R. T. (1990). Opening of Ca²⁺ channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol-1,4,5-triphosphate. *Nature, 343: 567-570.*
- ANDERSSON, B., ANDERSON, J.M. (1980). Lateral heterogeneity in the distribution of the chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochimica et biophysica acta, 593: 427-440.*
- ANDRIS, H., MITCHAM, B. Y CRISOSTO, C. (2000). Fruit Physiological Disorders. *En Internet: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/Disorders/apple/pdapbit.html>.*
- ARTIEDA, O. (1996). Génesis y distribución de suelos en un medio semiárido. Quinto de Ebro (Zaragoza). *Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Madrid. Pp 1-23*
- ASCASO, J. (1994). Espermatófitos de interés agronómico. *Universidad de Zaragoza. Escuela Universitaria Politécnica de Huesca. pp. 21-23.*
- ATKINSONS D. (1986). The nutrient requirements of fruit trees. Some Current Considerations. *Advances in Plant Nutrition Vol. 2 (Tinker, B; Läuchli, A. Ed) Praeger, New York, 93-128*
- AUDUS, L.J. (1959). Plant growth substances. *Interscience Publishers, New York.*
- AYLING, S.M. Y CLARKSON, D.T. (1996). The Cytoplasmic Streaming Response of Tomato Root Hairs to Auxin; the Role of Calcium. *Journal of Plant Physiology, 23: 699-708.*
- AZNAR, Y., BLANCO, A. Y VAL, J. (1999). Evaluación de parámetros para determinar el desarrollo final del fruto en manzano. *Actas de Horticultura, 26: 171-177.*
- AZNAR, Y., CORTÉS, E., MONGE E., BLANCO, A. Y VAL, J. (2000). Caracterización catiónica de manzanas afectadas por bitter pit. *VIII Simposium Nacional. IV Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas. (en prensa).*

- BANGERTH, F. (1974). Antagonism between calcium and other elements in the apple fruit. *Acta Horticulturae*, 45: 49-52
- BANGERTH, F. (1979). Calcium-related physiological disorders of plants. *Annual review or Agricultural and Food Chemistry*, 11: 204-207
- BANUELOS, G.S., BANGERTH, F. Y MARSCHNER, H. (1987). Relationship between polar basipetal auxin transport and acropetal Ca^{2+} transport into tomato fruits. *Physiologia Plantarum*, 71: 321-327.
- BARBER, S. A., WALKER, J. M., VASEY, E. H. (1963). Mechanisms for the movement of plant nutrients from the soil and fertilizar to the plant root. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 11: 204-207.
- BAR-TAL, A.; KEINAN, M.; FISHMAN, S.; ALONI, B.; OSEROVITZ, Y.; GENARD, M.; BARYOSEF, B. (ED.); SEGINER, I. (1999). Simulation of environmental effects on Ca content in pepper fruit. *Acta Horticulturae*, 507: 253-262.
- BEN, J (1995). Influence of rootstock on mineral content and storage of apple fruits. *Acta-Horticulturae*, 383: 353-358.
- BEN, J (1997). Effect of the concentration of mineral constituents in apples on their postharvest quality and storage perfomance I. Relations between the mineral composition of apples and their susceptibility to physiological disorders. *Folia Horticulturae*, 9:1, 43-50.
- BERGMANN, W. (1992). Nutritional disorders of plants. Development, Visual and Analytical Diagnosis, pp 132-151.
- BETRÁN, J.A.; VAL, J.; MONTAÑÉS-MILLÁN, L.; MONGE, E.; MONTAÑÉS, L. Y MORENO, M.A. (1997). Influence of rootstock on the mineral concentrations of flowers and leaves from sweet cherry. *Acta Horticulturae*, 448: 163-167.
- BLANCAFLOR, E.B., GILROY, S. (2000). Plant cell biology in the new millennium: new tools and new insights. *American Journal of Botany*, 87 (11): 1547-1560.
- BLASCO, A. B. (1976). Rootstock effects on growth and cropping of apples, with special reference to fruit quality. *Tesis doctoral Universidad de Londres*.
- BLASCO, A. B. (1977). "Bitter pit": una revisión de los factores que influyen sobre su incidencia. *ITEA* 27: 2-7

- BLATT, M. R., THIEL, G., TRENTAM, D. R. (1990). Reversible inactivation of K⁺ channels of *Vicia* stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature*, 346: 766-769.
- BONANY, J. (2001) Manzano. La Horticultura Española. *Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (SECH)*. Córdoba. España.
- BRAAM, J. (1992). Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured Arabidopsis cells: induction by calcium and heat shock. *Proceedings of the national academy of Sciences of the USA*, 89: 3213-3216.
- BRADFIELD, E. G. (1976). Calcium complexes in the xilem sap of apple shoots. *Plant soil*, 44: 495-499.
- BROOM, F.D., SMITH G.S., MILES D.B., GREEN T.G.A., (1998). Within and between tree variability in fruit characteristics associated with bitter pit incidence of 'Braeburn' apple. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73: 555-561.
- BÜNEMANN, G. (1961). Bitter pit research on the basis of the nutrient hypothesis. *Bull. Inst. Intern. Froid. Anenexe*, 1: 145-154.
- BURMEISTER, D.M. Y DILLEY, D.R. (1993). Characterization of Mg²⁺ induced bitter pit-like symptoms on apples: a model system to study bitter pit initiation and development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1203-1207.
- BUSH, D.S. (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 95-122.
- CAÑIZO, J. Y ARROYO, M. (1964). Enfermedades y plagas del manzano. *Ministerio de Agricultura*.
- CARLSSON, R.F., ROM, R.C. (1987) Rootstocks for fruit crops. *John Wiley & sons*. New York, 494 pp.
- CARRERA, M. (1999). Variedades y calidad de las manzanas en Aragón. *Unidad de Fruticultura SIA-DGA*. Ed. Apeph.
- CASERO, T. (1995). La nutrición cálcica en frutales. *Fruticultura profesional*, 71, 45-55.

- CASERO, T., RECASENS, I., CARRASCO, V., XUCLA, F. (1999). Dinámica de acumulación de nutrientes en manzana. *Investigaciones Agrarias: Producción y protección vegetal*, 14 (3): 465-473.
- CORTÉS, E. (2000). Caracterización química de manzanas afectadas por bitter pit. *Proyecto Fin de Carrera. Escuela Universitaria Politécnica de Huesca-Estación experimental de Aula Dei*.
- COSTA J., BOSCH M., BLANCO A., (1995). Growth and crpping of "Blanquilla" pear trees treated with paclobutrazol. *Journal of Horticultural Science*, 70 (3): 433-443.
- CURTIS, D., T.L. RIGHETTI, E., FACTEAU, T. (1990). Mineral analysis from corkspotted and normal Anjou pear fruit.
- COTE, G.G., CRAIN, R.C. (1993). Biochemistry of phosphoinositides. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 44: 333-356.
- COUTANCEAU (1965). Fruticultura técnica y económica de los cultivos de rosáceas leñosas productoras de frutas.
- CUTTING, J.G.M., BOWER, J.P., BANGERT, F. (1990). Why study plant growth substances in subtropical crops?. *Acta Horticulturae*, 275: 477-482.
- CUTTING, J., BOWER J.P. (1990). Relationship between auxin transport and calcium allocation in vegetative and reproductive flushes in avocado. *Acta Horticulturae* 275: 469-475.
- CHAMEL, A.R., BOSSY, J.P. (1981). Electrón-microprobe análisis of apple fruits tisúes affected with bitter pit. *Scientia Horticulturae*, 15: 155-163.
- CHIU, T.F. Y BOULD, C. (1976). Effects of shortage of calcium and other cations on ⁴⁵Ca mobility, growth and nutritional disorders of tomato plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27: 969-977.
- CHIU, T.F. Y BOULD, C. (1977). Sand-culture studies on the calcium nutrition of young apple trees with particular reference to bitter pit. *Journal of Horticultural Science*, 52: 19-28.
- DAVIES, P.J. (1995). Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Dordrecht: Kluwer.

- DEKOCK, P.C., BOGGIE, R., INKSON, R.H. (1982). The effect of water stress and form of nitrogen on the incidence of blossom-end-rot in tomatoes. *Journal of Science of Food Agriculture*, 33: 509-515.
- DELONG, W. A. (1936). Variations in the chief ash constituents of apples affected with blotchy cork. *Plant Physiology*, 11: 453-456.
- DUARTE, L. (1993). The rootstock effects on some nutrient level in leaves of apple tree cv. Granny Smith. In: Optimization of Plant Nutrition (Fragoso MAC, Beusichem ML, Houwvers A, eds.). *Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (Holanda) pp 517-521.*
- EMMERT, F.H. (1959). Chemical analysis of tissues as a means of determining nutrient requirements of deciduous fruits plants. *Proceedings of American Society for Horticultural Science*, 73: 521-547.
- FAILLA, O., POMA TRECCANI, C., Y MIGNANI, I. (1990). Water Status, Growth and Calcium Nutrition of Apple Trees in Relation to Bitter Pit. *Scientia Horticulturae*. 42: 55-64.
- FAUST, M., Y SHEAR, C.B. (1968). Corking disorders of apples: a physiological and biochemical review. *Botany Review*, 34: 441-469.
- FAUST, M. (1989). Physiology of temperate zone fruit trees.
- FELLE, H. (1988). Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta*, 174: 495-499.
- FERGUSON, I.B., Y WATKINS, C.B. (1989). Bitter pit in apple fruit. *Horticultura Reviews*, 11: 289-355.
- FOCHESSATI, A. (1975). Bitter pit in apples. *Decidious Fruit Grower*, 25: 47-54.
- FORSYTH, F.R. Y WEBSTER, D.H. (1971). Volatiles from McIntosh apple fruits as affected by phosphorus and potassium nutrition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 96: 259-263.
- FRIED, M.; SHAPIRO, R. E. (1961). Soil-Plant relationships in ion uptake. *Annual Review of Plant Physiology*, 12: 91-112
- FUENTES, J. L. (1997). Manual Práctico sobre utilización de Suelos y Fertilizantes.

- FUKUMOTO, M. Y NAGAI, k. (1983). Possible roles of calcium and ammonium in the development of bitter pit in apple. *Physiologia plantarum*, 59 (2): 171-176.
- GAGNARD, J. (1987). Apples. *En Plant analysis as a guide to the nutrient requirements of temperate and tropical crops*. 207-229.
- GARMAN, P. Y MATHIS. W. T. (1956). Studies of mineral balance as related to occurrence of Baldwin spot in Connecticut. *Connecticut Experiment Station Bulletin*. 601.
- GIL MARTINEZ, F (1995). Elementos de Fisiología Vegetal. Relaciones hídricas. Nutrición mineral. Transporte. Metabolismo. *Mundi-Prensa. Madrid*.
- GIL-ALBERT, F. (1998). Tratado de arboricultura frutal. *Ediciones Mundiprensa. Madrid. Vol.II. pp. 169-190*.
- GILROY, S., BETHKE, P. C., JONES, R. L. (1993). Calcium homeostasis in plants. *Journal of cell science*, 106: 453-462.
- GILROY, S., HUGHES, W. A., TREWAVAS, A. J. (1987). Calmodulin antagonists increase free cytosolic calcium levels in plant protoplasts in vivo. *Febs letters*, 212: 133-137.
- GILROY, S.; HUGHES, W. A.; TREWAVAS, A. J. (1990) Elevation of cytosolic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature*, 346: 769-771.
- GRABOV, A., BLATT, M.R. (1998). Membrane voltage initiates Ca²⁺ waves and potentiates Ca²⁺ increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proceedings of Natural Academic Science. USA. Plant Biology*, 95: 4778-4783.
- GRANELLI, G., UGHINI, V. (1988). Harvest and post-harvest apple quality influenced by boron application. *Acta Horticulturae*, 258: 405-412.
- HANGER, B. C. (1979) The movement of calcium in plants. *Communications in soil science and plant analysis*, 10 (1&2), 171-179.
- HANSON, J. B. (1984) The function of calcium in plant nutrition. *Advances in Plant Nutrition (Tinker P. B. and Läuxhli A., eds.) pp. 149-208. Praeger, New York*.

- HARMON, A. C., PUTNAMS-EVANS, C. Y CORNIER, M. J. (1987) A calcium-dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean. *Plant Physiology*, 8: 383
- HARMON, A. C., GRIBSKOV, M. Y HARPER, F. (2000). CDPKS – a kinase for every Ca^{2+} signal? *Trends in Plant Science*, 5: 154-159.
- HARPER, J. F., SUSSMAN, M. R., SCHALLER, G. E., PUTNAM-EVANS, C., CHARBONNEAU, H. (1991). A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain to calmodulin. *Science*, 252: 951-954.
- HEPLER, P.K., WAYNE, R. O. (1985). Calcium and plant development. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 36: 397-439.
- HERREGODS, M. (1993). Preservation of quality and nutritional value by CA storage. *Proc. The post-harvest treatment of fruit and vegetables, Milan, Italy*, 14-23
- HERTEL, R. (1983). The mechanism of auxin transport as a model of auxin action. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*. 112: 53-67.
- HIMELRICK, D. Y MCDUFFLE, R.F. (1983). The Calcium Cycle: Uptake and Distribution in Apple Trees. *Horticulture Science*, 18: 147-150.
- HOPFINGER, J.A., POOVAIAH, B.W. (1979). Calcium and magnesium gradients in apples with bitter pit. *Communicationes in Soil-Science and Plant Analysis*, 10: 1-2; 57-65.
- HOPFINGER, J.A., POOVAIAH, B.W., PATTERSON, M.E. (1984). Calcium and magnesium interactions in browning of « Golden Delicious » apples with bitter pit. *Scientia- Horticulturae*, 23 (4): 345-351.
- HUGHES, W. A. Y TREWAVAS, A. J. (1987). Calmodulin antagonists increase free cytosolic calcium levels in plant protoplasts in vivo. *Febs Letters*, 212: 133-137.
- JACKOBSEN, S.T., (1993a). Interaction between plant nutrients. III Antagonism between potassium, magnesium and calcium. *Acta horticulturae Scandinavica*, 43: 1-5.
- JACKOBSEN, S.T., (1993b). Interaction between plant nutrients. IV. Interaction between calcium and phosphate. *Acta horticulturae Scandinavica*, 43: 6-10.

- JACOBS, W.P. (1961). The polar movement of auxin in the shoots of higher plants: its occurrence and physiological significance. *In Plant growth regulation. International Conference of Plant Growth Reg. 4th*. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- JANDIK, P. Y JONES, W. (1992). Electrophoretic Capillary Ion Analysis: Origins, Principles and Applications. *Lc-Gc International, vol 5, n°1. pp.1-17*.
- JENA, P. K.; REDDY, A. S.; POOVAIAH, B. W. (1989). Molecular cloning and sequencing of a cDNA for plant calmodulin: signal-induced changes in the expression of calmodulin. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA, 86: 3644*.
- JOHNSON, D.S., MARKS, M.J. y PEARSON, K. (1987). Storage quality of Cox's Orange Pippin apples in relation to fruit mineral composition during development. *Journal of Horticultural Science, 62: 17-25*.
- JONES, R. G. AND LUNT, O.R. (1967). The function of calcium in plants, *Botanical Review, 33: 407-26*.
- JONES, J. B., JR., B. WOLF, MILLS, H. A.. (1991). Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide.
- KABATA-PENDIAS, A. Y PENDIAS, H. (1992). Trace elements in plants. *En: trace elements in soils and plants. Ed. CRC press*.
- KAMPURATH, E. J., FOY, C.D. (1971). Lime-fertilizer-plant interactions in acid soils. *Fertilizer Technology & Use, 2nd Edition, Soil Science of Society American., Nadison, Wisc., USA, pp.: 105-151*.
- KARMOKER, J. L. AND VAN STEVENINCK, R. F. M., 1978. Stimulation of volume flow and ion flux by abscisic acid in excised root systems of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Redland pioneer. *Planta 141: 37-43*.
- KIRKBY, E.A. Y MENGEL, K. (1976). The role of magnesium plant nutrition. *Zeitschrift Pflanzenernahrung und Bodenkunde, 2: 209-222*.
- KIRKBY, E.A. Y PILBEAM, D.J. (1984). Calcium as a plant nutrient. *Plant, cell and environment. 7: 397-405*
- KNIGHT, M. R.; CAMPBELL, A. K.; SMITH, S. M.; TREWAVAS, A. J. (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature, 352: 524-526*

- KOTZE, W.A.G. (1979). Ionic interactions in the uptake and transport of calcium by apple seedlings. *Soil Science and Plant analysis*, 10: 115-127.
- KUPFERMAN, E. M. (1997). Controlled atmosphere storage of apples. Proc. 7th Intl C.A. Res. Conf. Univ. of California, Davis. 1-30.
- LANG, A. y VOLZ, R.K. (1998). Spurs leaves increase calcium in young apples by promoting xylem inflow and outflow. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123: 956-960.
- LE SAOS, J. (1976). Migration du calcium vers les organes aeriens chez un halophyte *Cochlearia anglica* L. Effect du NaCl. *Physiologie Vegetale*. 14: 381-390.
- LEECE, D.R., GILMOUR, A.R. (1974) Diagnostic leaf analysis for stone fruit 2- Seasonal changes in the leaf composition of peach. *Austral Journal Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 14: 822-827.
- LEÓN, A. (1991). Caracterización agroclimática de la provincia de Huesca. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de la Producción Agraria. 2ª edición. Madrid 1991. pp.29-53*
- LEONARD, R. T., HEPLER, P. K. (1990). Calcium in plant growth and development. En: *Current topics in plant physiology*. Vol 4. *American Society of plant physiologists*. Rockville.
- LEOPOLD, A.C., KRIEDEMANN P. E. (1975). The dynamics of Growth. *Cap. 3 Plant Growth and development. McGraw-Hill series In Organismic Biology. Pp. 77-80. McGraw-Hill. New York.*
- LEWIS, T.L. Y MARTIN, D. (1973). Longitudinal distribution of applied calcium, and of naturally occurring calcium, magnesium, and potassium, in Merton apple fruits. *Australia. Journal of Agricultural Research*, 24: 363-371.
- LIDSTER, P. D.; PORRITT, S. W.; EASTON, G. W. Y MASON, J. (1975). Spartan apple breakdown as affected by orchards factors, nutrient content and fruit quality. *Canadian Journal of Plant Science*, 55: 443-446.
- LINK, H. (1973). Effect of fruit thinning on some components of fruit quality in apples. *Acta Horticulturae*, 34: 445-448.
- LINK, H. (1976). Ca uptake and translocation by plants with special regard to apple trees. *Acta Horticulturae*. 45: 53-60.

- LOONEY, N.E. (1979). Some effects of gibberellins A(4+7) plus benzyladenine on fruit weight, shape, quality, Ca content and storage behaviour of "Spartan" apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104: 389-391.
- LUCENA, J. J. (1997). Methods of diagnosis of mineral nutrition of plants. A critical review. *Acta Horticulturae*, 448: 179-192.
- LUDDERS, P., BUNEMANN, G. Y ORTMANN, U. (1970). Der Einfluss jahreszeitlich unterschiedlicher Stickstoffversorgung auf das Wachstum von Apfelbäumen. VI *Mineral-stoffgehalt holziger Baumteile. Gartenbauwissenschaft*, 35: 233-246.
- LÜDDERS, P. (1979) The effect of nitrogen nutrition on bitter pit in apples. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 10 : 1-2 ; 401-415.
- MARCELLE, R. D. (1990). Predicting storage quality from preharvest fruit mineral analyses. A review. *International Symposium on Diagnosis of Nutritional Status of Deciduous Fruit Orchards. Acta Horticulturae* 274, 305- 313.
- MARCELLE, R. D. (1995). Mineral nutrition and fruit quality. *Acta Horticulturae*, 383: 219-225.
- MARIGO, G.; BOYSSON, H.; Y BONDET, A.M. (1966). Accumulation des ions nitrate et malate dans des cellules de *Catharanthus roseus* et incidence sur le pH vacuolaire. *Physiologie Vegetale*, 24: 15-23.
- MARSCHNER, H. (1974). Calcium nutrition of higher plants. *Netherlands Journal of Agricultural Sciences*, 22: 275.
- MARSCHNER, H. (1983). General Introduction to the mineral nutrition. *Inorganic Plant Nutrition. (Lauchi A, Bielecki R.L., Eds). pp.5-60. Springer-Verlag. Berlín (Alemania).*
- MARSCHNER, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2º edición. *Academic Press, San Diego. USA*
- MARTIN-PREVEL, P., GARNARD, J., GAUTIER, P. (1984). Plant analysis, as a guide to the nutrient requirements of temperate and tropical crops. *Lavoisier Publishing Inc.*, 207-229.
- MATA, A.P. (2000). Evaluación de Calcimax como corrector de bitter pit en manzano. *Proyecto Fin de Carrera. E.U.P. Huesca.*

- MATTOO, A.K. y LIEBERMAN, M. (1977). Localization of the ethilene-synthesizing system in apple tissue. *Plant Physiology*, 60: 794-799.
- MAUSETH, J.D. (1991). Botany: An introduction to Plant Biology. Philadelphia: Saunders. pp. 348-415.
- MEHERIUK M. (1993). CA sotrage conditions for apples, pears and nashi. *Proc. 6th Intl. C.C.A. Res- Con., Cornell Univ., Ithaca, New York*. Vol 2: 819-858
- MILLER, G.S. Y SWIETLIK, D. (1986). Long-term response of bearing apple trees to paclobutrazol. *Hortoscience*, 21: 851.
- MISSOTTEN, C. (1996) Influence des elements nutritifs sur la qualité des fruits. *Le fruit Belgique* 461: 72-78.
- MONCRIEF, N. D., KRETSINGER, R. H., GOODMAN, M. (1990). Evolution of EF-hand calcium modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *Journal of molecular evolution*, 30: 522-562.
- MONGE, E. AND J. VAL (1990). An updated review on the role of trace elements in higher plants. I. Manganese. *Anales de la Estacion Experimental de Aula Dei* 20(1-2): 65-90.
- MONGE, E. (1991). El hierro modulador de la estructura y función del cloroplasto. *En: Fijación y movilización biológica de nutrientes, I:* 85-108.
- MONGE, E., VAL, J., SANZ, M., BLANCO, A. Y MONTAÑÉS, L. (1995). El calcio nutriente para las plantas. Bitter pit en manzano. *Anales de la Estación Experimental Aula Dei*, 21: 189-201.
- MONTAÑÉS, L., HERAS, L., SANZ, M. (1991) Desviación del óptimo porcentual (DOP): Nuevo índice para la interpretación del análisis vegetal. *Anales de la estación Experimental de Aula Dei*, 20 (3-4): 91-107.
- MONTAÑÉS-MILLÁN, L.; VAL, J.; BETRÁN, J.; MORENO, M.A. Y MONTAÑÉS, L. (1997). Floral analysis: fresh and dry weight of flowers from different fruit tree species. *Acta Horticulturae*, 448: 233-239.
- MURGA, J. Y PALAZÓN, I. (1984). Manual de inspección de peras y manzanas. S.O.I.V.R.E.- I.N.I.A. Madrid.
- MUTO, S., MIYACHIS, S. (1977). Properties of a protein activator of NAD kinase from plants. *Plant physiology*, 59: 55-60.

- MUTO, S. (1992). Intracellular Ca²⁺ messenger system in plants. *International review of cytology*, 142: 305-345.
- NAVARRO S. Y NAVARRO G. (2000). Química Agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. *Ediciones Mundi-Prensa* pp.295-308.
- NURZYNSKI, J., A. KOMOSA, WESOLOWSKA-JANCZAREK, M.; KEPKA, M.; KOZERA, G. (1990). Seasonal changes of N, P, K, Ca and Mg content in apple tree leaves during vegetation period. *Acta Horticulturae*, 274: 365-373.
- OLIVIER, C.M., WOOLDRIDGE, J. Y KOTZE, W. (1994). Apple quality as related to nitrogen and phosphorus nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 17: 1005-1015.
- OSERKOWKT, J. (1933). Quantitative relation between chlorophyll and Fe in green and chlorotic pear leaves. *Plant Physiology*, 8: 449-468.
- PAIVA, E.A., PRIETO MARTÍNEZ, H., DIAS CASALI, V.W. Y PADILHA, L. (1998). Occurrence of blossom-end rot in tomato as a function of calcium dose in the nutrient solution and air relative humidity. *Journal of Plant Nutrition*. 21: 2663-2670.
- PATE, J. S. (1976). Exchange of solutes between phloem and xylem and circulation in the whole plant. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Vol. 1. Transport in plants I. Phloem transport* (Zimmerman, M.H., & Milburn, J. A. eds.) pp.: 451 Sprienger-Verlag, Berlin.
- PEQUERUL, A., PÉREZ, C., MADERO, P., VAL, J., MONGE, E. (1993). A rapid wet digestion method for plant analysis. *In Optimization of Plant nutrition*. Editores: Frago, M. A. C. Y M. L. Van Beusichem pp3-6
- PERRING, M. A. (1986). Incidence of bitter pit in relation to the calcium content of apples problems and paradoxes, a review. *Journal Science Food Agr.*, 37: 591-606.
- PERRING, M. A., PEARSON, K. (1987). Suppression of bitter pit by calcium injected into the core cavities of harvested apples. *Journal of Horticultural Science*, 62: 303-304.
- PLISEK, B. (1995). Development and prediction of calcium content in apples. *Acta Horticulturae*. 383: 463-474.

- POOVAIAH, B.W. Y REDDY, A.S. (1987). Calcium messenger system in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 6: 47-103.
- POOVAIAH, B.W., REDDY, A.S. Y MCFADDEN, J.J. (1987). Calcium messenger system: role of protein phosphorylation and inositol phospholipids. *Physiologia Plantarum*. 69: 569.
- POOVAIAH, B.W., GLENN, G. M. Y REDDY, A.S. (1988). Calcium and fruit softening: physiology and biochemistry. *Horticultural Reviews*, 10: 107.
- POOVAIAH, B.W. Y REDDY, A.S. (1993). Calcium and Signal Transduction in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 12(3): 185-211.
- POOVAIAH, B.W. (1993). Biochemical and molecular aspects of calcium action. *Acta Horticulturae*. 326: 139-147.
- PRESTON, A.P. Y PERRING, M.A. (1974). The effect of summer pruning and nitrogen on growth, cropping and storage quality of Cox Pippin apple. *Journal of Horticulture Science*, 49: 77-83.
- PUTNAM-EVANS, C L., HARMON, A. C., ., AND CORNIER, M. J (1990) Purification and characterization of a novel calcium-dependent protein kinase from soybean. *Biochemistry*, 29 : 2488.
- PUTRA, P. Y BOTTON, B. (1998). Organic and Inorganic Compounds of Xilem Exudates from five Woody Plants at the Stage of Bud Breaking. *Journal of Plant Phisiology*, 153: 670-676.
- QUILAN, J. D. (1969) Chemical composition of developing and shed fruits of Laxtan's Fortune apple. *Journal of Horticulture Science*, 44: 97-106.
- RAESE, J., DRAKE, S.R. (1997). Nitrogen fertilization and elemental composition affects fruit quality of 'Fuji' apples. *Journal of plant nutrition*, 20 (12): 1797-1809.
- RAESE, J.T. (1998) Response of apple and pear to nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers. *Journal of Plant Nutrition*, 21 (12): 2671-2696.
- RAESE, J. T., DRAKE, S.R. (2000). Effect of calcium spray materials, rate, time of spray application, and rootstocks on fruit quality of 'Red' and 'Golden Delicious' apples. *Journal of Plant Nutrition* 23(10): 1435-1447.

- RAHIMI, H.M. Y SCHROPP, A. (1984). Carboanhydrase activity and extractable zinc as indicator of the zinc supply of plants. *Zeitschrift für Pflanzenernahrung und Bodenkunden*, 147: 572-583.
- RASMUSSEN, H., BARRET, P. Q. (1984) Calcium messenger system: An integrated view. *Physiological reviews*, 64 (3): 938-984.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F., Y EICHORN, S.E. (1998). *Biology of Plants*. New York: Worth. pp. 545-572.
- REDMON, W. J. (1975). Transport of calcium in apple trees and its penetration into the fruit. *Communications in soil Science and Plant analysis*, 6: 261.
- RETAMALES, J.B.; LEPE, V.P.; HERREGODS, M.(ED.); BOXUS, P. (ED.); JAGER, A. (2000). Control strategies for different bitter pit incidences in Braeburn apples. *Acta Horticulturae*, 517: 227-233.
- RETAMALES, J.B.; VALDES, C.; DILLEY, D.R.; LEON, L.; LEPE, V.P.; POSSINGHAM, J.V.(ED.); NEILSEN, G.H.(2000). Bitter pit prediction in apples through Mg infiltration. *Acta Horticulturae*, 512: 169-179.
- ROBERTS, D. M., HARMON, A. C. (1992). Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 43: 375-414.
- ROBERTS, D. M., ROWE, P. M., SIEGEL, F. L., LUKAS, T. J. Y WATTERSON, D. M. (1986). Trimethyllysine and protein function: effect of methylation and mutagenesis of lysine-115 of calmodulin on nad kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*. 261: 1491-1494.
- ROUX, S. J. Y SLOCUM, R.D. (1982). Role of calcium in mediating cellular functions important for growth and development in higher plants. *En: Calcium and Cell Function*. 3 (Cheung, W. Y. ed.) Academic Press. New York.
- ROY, S.; CONWAY, W.S.; WATADA, A. E.; SAMS, C.E.; ERBE, E.F. Y WERGIN, W.P. (1999). Changes in the Ultrastructure of the epicuticular Wax and Postharvest Calcium Uptake in Apples. *HortScience*, 34 (1) : 121-124.
- RUDD, J. J.; FRANKLIN-TONG, V. E. (1999). Calcium signaling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55 (2): 214-232.
- SADOWSKI, A. Y CZESCIK, M. (1977). Studies on bitter pit of apples. V. Osmotic concentration and mineral content in different parts of fruit and incidence of pits. *Journal of plant nutrition*, 16 (9): 1807-1819.

- SADOWSKI, A.; LENZ, F.; ENGEL, G. Y KEPKA, M. (1995). Effect of fruti load on leaf nutrient content of apple trees. *Acta Horticulturae*, 383: 67-71.
- SALISBURY, F.B., Y ROSS, C.W. (1992). Plant Physiology. Belmont, CA: Wadsworth. pp. 357-407; 531-548.
- SANZ, M., HERAS, L., MONTAÑÉS, L. (1991). Foliar diagnosis in peach: reference nutrient contents throught the season. *Anales de Aula Dei (Zaragoza)*, 20 (3-4): 67-73.
- SANZ, M., HERAS, L., MONTAÑÉS, L. (1992). Relationships between yield and leaf nutrient contents in peach trees: Early nutritional status diagnosis. *Journal of Plant Nutrition*, 15 (9): 1457-1466.
- SANZ, M., MONTAÑÉS, L. (1993). Diagnóstico foliar continuado en melocotonero: valores de referencia. *ITEA 89V* (2): 79-89.
- SANZ, M (1994). Botánica de las plantas cultivadas. Pp: 193-197.
- SANZ, M.; CARRERA, M. Y MONTAÑÉS, L. (1994). The possibility of using floral analysis to diagnose the nutritional status of pear trees. *Acta Horticulturae*, 367: 290-295.
- SANZ, M., VAL, J., MONGE, E., MONTAÑÉS, L. (1995). Is it possible to diagnose the nutritional status of pezh trees by chemical analysis of their flowers?. *Acta Horticulturae*, 383: 159-163.
- SANZ, M., MONTAÑÉS, L. (1995). Flower analysis as a new approach to diagnosing the nutritional status of the peach tree. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 1667-1675.
- SANZ, M., BELKHODJA, R., TOSELLI, M., MONTAÑÉS, L., ABADIA, A., TAGLIAVINI, M., MARANGONI, B., ABADIA, J. (1997). Floral analysis as a possible tool for the prognosis of iron deficiency in peach. *Acta Horticulturae*, 448: 241-245.
- SANZ, M., PÉREZ, J., PASCUAL, J. Y MACHÍN, J. (1998). Prognosis of iron chlorosis in apple trees by floral analysis. *Journal of Plant Nutrition*, 21: 1697-1703.
- SANZ M. Y MACHIN J. (1999). Aplicacion del analisis floral al pronóstico y diagnóstico del bitter pit. *Información técnica Económica Agraria (ITEA)*, 95 (2): 118-124.

- SANZ, M.A., BLANCO, A., VAL, J. (2000). Inhibición del crecimiento de plantas de tomate por la deficiencia inducida de calcio. *Información técnica Económica Agraria (ITEA)*, 96V, 3: 207-217.
- SANZ, M.A., BLANCO, A., MONGE, E., VAL, J. (2001). Caracterización de la deficiencia de calcio en plantas de tomate utilizando parámetros fisiológicos. *Información técnica Económica Agraria (ITEA)*, 97V, 1 (en prensa).
- SAURE, M.C. (1996). Reassessment of the role of calcium in development of Bitter Pit in apple. *Australian Journal of Plant Physiology*. 23: 237-243.
- SCAIFE, M. A. Y CLARKSON, D. T. (1978). Calcium-related disorders in plants- a possible explanation for the effect of weather. *Plant Soil*, 50: 723-725.
- SCHROEDER, J.I., HAGIWARA, S. (1990). Repetitive increases in cytosolic Ca^{2+} of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca^{2+} permeable channels. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, 87: 9305-9309.
- SHARPLES, R. O. (1964). Cell characteristics of Cox's Orange Pippin apples from different commercial orchards. *Annual Report of the East Malling Research Station for 1963: 143-148.*
- SHARPLES, R. O. (1980). Orchard nutrition and fruit storage quality in the UK. *Mineral Nutrition of Fruits Trees (Atkinson, D. Et al. Ed.) Butterworths London: 17-28.*
- SHEAR, C.B. Y FAUST, M. (1970). Calcium transport in apples trees. *Plant Physiology*. 45: 670-674.
- SHEAR, C.B. Y FAUST, M. (1971). Don't neglect Calcium in your apple tree's diet. *American Fruit Grower: 18-23.*
- SHEAR, C.B. (1975). Calcium-related disorders of fruits and vegetables. *Hortscience*. 10 (4): 361-365
- SILLAMPAA, M. (1976) Los oligoelementos en el suelo y en la agricultura. Ed. FAO. Roma *El calcio en la planta: transporte y absorción*
- SIMON, E.W. (1978). The symptoms of calcium deficiency in plants. *New Phytologist*, 80: 1-15.

- SMOCK, R.M. Y VAN DOREN, A. (1937). The Histology of Bitter pit in apples. *Proceedings Journal of the American Society for Horticultural Science*, 35: 176-179.
- SIÓ, J. Y BOIXADERA, J. (1995). Suelos y Fertilización en producción integrada de manzano. *Fruticultural Profesional. Especial Producción Integrada*, 70: 87-99.
- SIO, J., USALL, J., CABELLO, S. ARAGAY, M., BOIXADERA, J. (1998). Estudio de las características de los uelos y su influencia sobre la calidad y aptitud a la conservación de la manzana «Golden» en la zona frutícola de Lleida (II). Calidad y aptitud de conservación. *Fruticultuta porfesional*, 94: 36-50.
- STEBBINS, R.L. Y DEWEY, D.H. (1972). Role of transpiration and problem transport in accumulation of ^{45}Ca in leaves of young apple trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 97: 471-474.
- STEENKAMP, J. Y TERBLANCHE, J.H. (1983). The role of organic acids and nutrient elements in relation to bitter pit in Golden Delicious apples. *Acta Horticulturae*. 138: 35-42.
- STOW, J. (1993) Effect of calcium ions on apple fruit softening during storage and ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 3: 1-9.
- STRYNADKA, N. C., JAMES, M. N. (1989). Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annual review of biochemistry*, 58: 951-998.
- SWIETLIK, D. Y FAUST, M. (1984). Foliar nutrition of fruit crops. *Horticulturae Review*.6: 287-355.
- TAGLIAVINI, M., ZAVALLONI, C., ROMBOLA, A.D., QUARTIERI, M., MALAGUTI, D., MAZZANTI, F. MILLARD, P., MARANGANI, B., POSSINGHAM, J.V. (ED); NEILSEN G.H. (2000). Mineral nutrient partitioning to fruits of deciduous trees. *Acta Horticulturae*, 512: 131-140.
- TERBLANCHE, J.H., GÜRGEN, K.H., BESTER, J.J.A. Y PIENAAR, W.J. (1979). Migration of Ca in Golden Delicious apples during storage, with special reference to bitter pit. *The Decidious Fruit Grower*: 46-54.
- THIMANN, K.V. (1934). Studies on the growth hormone of plants. VI. The distribution of the growth substance in plant tissues. *Journal of General Physiology*, 18: 23.

- TISDALE, S.L., NELSON, W.L., BEATON, J.D. (1985) Soil fertility and fertilizers. Macmillan Publishing, New York (USA).
- TOMALA, K., MYGA, W., KOBYLINSKA, J. (1993). Attempts at predicting storage ability of apples. Pre and Postharvest Physiology of Pome-fruit. *Acta Horticulturae*, 326: 149-156.
- TOMALA, K. (1997A). Predicting storage ability of "Cortland" apples. *Acta Horticulturae*. 448: 67-73.
- TOMALA, K. (1997B). Factors affecting nutrient content and fruits quality. *Acta Horticulturae*. 448: 257-264.
- TREWAVAS, A.J. (1986). Molecular and cellular aspects of calcium in plant growth and development. *Plenum. New York*.
- TUCKEY, H.B. (1964) DWARFED FRUIT TREES, 123-163.
- VAL, J., HERAS, L., MONGE, E., (1985). Nuevas ecuaciones para la determinación de pigmentos fotosintéticos en acetona. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*, 17: 231-238.
- VAL, J., ABADIA, J., HERAS, L., MONGE, E., (1986). Higher plant photosynthetic pigment analysis. Determination of caretonids and chorophylls. *Journal of micronutrient analysis*, 2: 305-312.
- VAL, J. AND E. MONGE (1990A). An updated review on the role of trace elements in higher plants. III. Copper. *Anales de la Estacion Experimental de Aula Dei* 20(1-2): 103-124.
- VAL, J. AND E. MONGE (1990B). An updated review on the role of trace elements in higher plants. II. Zinc. *Anales de la Estacion Experimental de Aula Dei* 20(1-2): 91-101.
- VAL, J., MONGE, E., BAKER, N.R. (1994). An improved method for rapid analysis of the xanthophyll-cycle pigments. *Journal of chromatographic Science*, 32: 286-289.
- VAL, J. (1999). Procedimiento visual de la distribución de calcio en secciones de frutos. N. de solicitud: 9802443. País de prioridad: España. Entidad titular: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- VAL, J., AZNAR, Y., GIL, A., MONGE, E. Y BLANCO, A.(1999). Un nuevo método de detección del bitter pit. *Actas de Horticultura*. 27 (4): 188-192.

- VAL, J., GIL, A., AZNAR, Y., MONGE, E., Y BLANCO, A. (2000). Nutritional study of an apple orchard as endemically affected by bitter-pit. *Acta Horticulturae*, 513: 493-512.
- VALENZUELA, J.L.; SÁNCHEZ, A.; ROMERO, L.. (1993). Análisis nutricional de las plantas mediante técnicas analíticas y bioquímicas. *Universidad de Granada*
- VANG-PETERSEN, O. (1974) Magnesium til aeble. I. *Tidsskrift Planteavl.*, 78: 627-634.
- VANG-PETERSEN, O. (1980) Calcium nutrition of apple trees: A review. *Scientia Horticulturae*, 12: 1-9
- VOLZ, R. K., FERGUSON, I., BOWEN, J. H., WATKINS, C. B. (1993). Crop load effects on fruit mineral nutrition, maturity, fruiting and tree growth of Cox's Orange Pippin apple. *Journal of Horticultural Science*, 68: 127-137.
- WALLER, W. M. (1980). Use of plant analysis. *En: Mineral nutrition of fruit trees: 383-394.*
- WALLWORTH, J.L., SUMMER, M.E. (1987). The diagnosis and recommendation integrated system (DRIS) 149-188. *En B.A. Stewart (eds). Advances of Soil Science Vol. 6 Springer-Verlag. New York (USA).*
- WESTWOOD, M. N., CHAPLIN, M. H., ROBERTS, A, N, (1973). Effects of rootstock on growth, bloom, yield, maturity and fruit quality of prune (*Prunus domestica* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 98: 352-357.
- WESTWOOD, M. N.(1982) Fruticultura de zonas templadas. *Ediciones Mundiprensa. Madrid, pp. 367-393.*
- WESTWOOD, M. N. (1993). Temperature- Zone Pomology. *Timber Press 275-298*
- WILKINSON, B.G. (1970). The effect of evaporation on storage disorders of apples. *Annual Report of the East Malling Research Station for 1969. pp. 125-127.*
- WILKINSON, B.G. (1972). Mineral composition of apples in relation to storage disorders. *Proceedings XVIIIth International Horticulturae Congress. pp. 1-7.*

- WILKINSON, B.G., PERRING, M.A. (1964). Further investigations of chemical concentration gradients in apples. *Journal Science Food Agriculture*, 15: 378-384.
- WOJCIK, P.; MIKA, A.; CIELINSKI, G.; MICHALCZUK, L. (1999). Effect of boron fertilization on the storage ability of apples (*Malus domestica* Borth). *Acta Horticulturae*, 485: 393-397.
- WOJCIK, P.; CIELINSKI, G.; POSSINGHAM, J.V.(ED.); NEILSEN, G.H. (2000). Effect of boron fertilization on yield and fruit quality of «Elstar» and «Sampion» apple cultivars. *Acta Horticulturae*, 512: 189-197.
- WOOLDRIDGE, C.G., WIENEKE, J. Y FUHR, F. (1974). The interaction between calcium and boron in apple seed-lings. *Zeitschrift Pflanzenernähr. Bodenkd.*137: 177-188.
- YAMADA, T. (1975). Calcium and its relationship to blossom-end rot in tomato. *Communication in Soil Science Plant Analysis*, 6: 273-284.
- ZIEGLER, H. (1975). Nature of transported substances. *Enciclopedia of Plant Physiology*, 1:59-100
- ZIELINSKI, R. E. (1998). Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 49: 697-725.
- ZIMMERMAN, M. H. (1969). Translocation of nutrients. *Physiology of Plant Growth and Development*, ed. M. B. Wilkins, pp. 383-417. London: McGraw.
- ZUDE, M.; ALEXANDER, A.; LUDDERS, P. (1997). Influence of summer boron sprays on storability in apple cultivar «Elstar». *Erwerbsobstbau*, 39:3, 62-64.

7. Anexo

